

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Efectos de un extracto de *Fraxinus excelsior* L. en ratas
espontáneamente hipertensas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Noemí López Carreras

Directoras

**M^a Amaya Aleixandre de Artiñano
Marta Miguel Castro**

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE
FARMACOLOGÍA

EFFECTOS DE UN EXTRACTO DE *FRAXINUS EXCELSIOR L.* EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS



TESIS DOCTORAL

NOEMI LÓPEZ CARRERAS
Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



**EFFECTOS DE UN EXTRACTO DE *FRAXINUS EXCELSIOR*
L. EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS**

TESIS DOCTORAL

Noemi López Carreras

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



EFFECTOS DE UN EXTRACTO DE *FRAXINUS EXCELSIOR* L. EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

Memoria presentada por:

Noemi López Carreras

Para optar al grado de **Doctor en Farmacología**

Directoras:

Dra. M^a Amaya Aleixandre de Artiñano

Catedrática de Farmacología

Dpto. de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

Dra. Marta Miguel Castro

Científico Titular

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid

Universidad COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



M^a AMAYA ALEIXANDRE DE ARTIÑANO, CATEDRÁTICA DE FARMACOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Y MARTA MIGUEL CASTRO, CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado "Efectos de un extracto de *Fraxinus excelsior* L. en ratas espontáneamente hipertensas", que constituye la Memoria que presenta la Licenciada Noemi López Carreras para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 22 de Enero de 2014

Fdo. M^a Amaya Aleixandre de Artiñano

Fdo. Marta Miguel Castro

A mis padres

Agradecimientos

Han pasado algo más de tres años desde que comencé esta aventura. Durante este tiempo he vivido momentos estupendos y otros no tan buenos, que me han ayudado a conocerme y superarme a mí misma. Ha sido, sin duda alguna, una etapa muy enriquecedora tanto en el aspecto profesional como en lo personal. Nada de esto hubiera sido posible sin la ayuda de todas las personas que han compartido conmigo esta etapa.

Quisiera agradecer especialmente a mis Directoras de Tesis, la Dra. M^a Amaya Aleixandre de Artiñano y la Dra. Marta Miguel Castro, por aceptarme en su grupo de investigación confiando en mí para la realización de esta Tesis Doctoral, por su ayuda, por sus valiosos consejos y sus ánimos durante estos años de formación.

Agradecer a la Universidad Complutense de Madrid por haberme concedido una beca predoctoral y darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación.

Dar las gracias a la actual Directora del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina, la Dra. Isabel Colado, por permitirme realizar en este Departamento mi Tesis Doctoral, y por su ayuda en la realización de un Trabajo de Investigación dentro del Doctorado en Ciencias Biomédicas. De igual forma a todos los componentes del Departamento de Farmacología, por su amable disposición y colaboración en todo lo requerido. A la Dra. M^a Pilar Bringas, Directora técnica del animalario de la Facultad de Medicina, y a todo el personal técnico y de servicios del mismo por su ayuda siempre que ha sido solicitada.

De igual forma agradecer la ayuda al personal administrativo y técnico del Departamento de Farmacología. A M^a Elena, por su siempre eficaz y necesaria ayuda administrativa. A Fernando y M^a Luisa, por su ayuda y colaboración, y un agradecimiento especial a Manolo Bas, por su gran ayuda y apoyo durante estos años, parte de este trabajo también es tuyo; gracias por enseñarme, por tu entera disposición y por esos desayunos tan divertidos con "ese café especial" de Paco.

A mis compañeros del Departamento, por todos los buenos y divertidos momentos pasados tanto en el Departamento como en los Congresos.

A la Dra. Mar Quiñones, por animarme en mis inicios y por enseñarme gran parte de las técnicas con las que he realizado este trabajo. A la que fue mi compañera de aventura, la Dra. Sandra Fernández, por su apoyo y sus ánimos en etapas de estrés, por las risas y por todos los momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio.

Agradecer a Rosario Hernández por su amabilidad y colaboración en parte de este trabajo.

Quisiera dar las gracias a la empresa Biopolis S.L., con la que he tenido la suerte de colaborar durante parte de este período, por su amabilidad y confianza en mí para la realización de uno de sus proyectos.

También agradecer a todos los componentes del Departamento de Bioactividad y análisis de alimentos, del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) por brindarme la posibilidad de realizar en él parte de esta Tesis. En especial a Marta Garcés por su siempre desinteresada ayuda con los experimentos y por todos los buenos momentos compartidos tanto fuera como dentro del CIAL.

A mis "Farmis", especialmente a Gema y a Bego, por tantos buenos momentos compartidos, por esas cenas interminables, por apoyarme y animarme en todo momento.

A Roci, por sus pequeños grandes detalles, por su positivismo y sus planes improvisados que hacían mucho más llevaderos los baches.

Gracias a ti Miguel, por quererme tanto y demostrármelo cada día, sobre todo durante esta última etapa de la tesis, que ha resultado tan dura para mí. Gracias por tu paciencia, por sacarme siempre esa sonrisa, por demostrarme que estas orgulloso de mí, y por confiar en mí más que yo misma. Como diría nuestro amigo Derbi: "Eternamente agradecida".

Gracias María del Amor y Juan Miguel por preocuparos por mí, por vuestros ánimos y sobre todo por cuidarme tan bien y considerarme una más.

Pero sobre todo y ante todo debo dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres, Nely y Ricardo, que siempre han creído en mis posibilidades y día a día me transmiten que están orgullosos de mí. No sé cómo agradecer vuestra infinita paciencia por aguantar día tras día mis agobios y mi nerviosismo. Gracias por vuestros incansables ánimos y por estar siempre ahí. Sin vosotros no habría conseguido llegar donde estoy. También quiero dar las gracias a mi hermano Daniel y a mi abuela Granny por estar siempre a mi lado, y a mis otros tres abuelos, Grampa, Conchita y Ricardo, que sé que me cuidan cada día desde el cielo. Gracias por todo.

"Son los problemas sin resolver, no los resueltos, los que mantienen activa la mente".

Erwin Guido Kolbenheyer.

ÍNDICE

Índice

RESUMEN	3
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR	19
1.2. PRINCIPALES FACTORES Y MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL	22
1.2.1. Músculo liso vascular y endotelio	22
1.2.2. Sistema renina-angiotensina	25
1.2.3. Balance redox y presión arterial	27
1.3. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL	34
1.4. INGREDIENTES BIOACTIVOS Y ALIMENTOS FUNCIONALES	39
1.5. FITOQUÍMICOS: TERPENOS IRIDOIDES	44
1.6. FRAXIPURE™	63
1.7. LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN	67
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
2.1. HIPÓTESIS	75
2.2. OBJETIVOS	75
3. MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1. PROTOCOLO GENERAL	77
3.2. ESTUDIOS PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE FRAXIPURE EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS	80
3.2.1. Efectos sobre la presión arterial	80

3.2.2. Efectos sobre la diuresis	85
3.2.3. Efectos sobre el balance redox	87
3.3. ESTUDIO PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE FRAXIPURE EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS	90
3.4. TÉCNICAS UTILIZADAS	93
3.4.1. Medida de la presión arterial	93
3.4.2. Extracción de sangre	94
3.4.3. Determinaciones de distintos analitos en plasma y orina	95
3.4.4. Homogeneización del tejido hepático y determinación de proteínas	99
3.4.5. Determinación de la capacidad antioxidante del plasma.....	100
3.4.6. Determinación de malonildialdehído en plasma y tejido hepático.....	101
3.4.7. Determinación de glutatión reducido en tejido hepático	102
3.4.8. Preparaciones de anillos de aorta en baños de órganos.....	103
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
4. RESULTADOS	109
4.1. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE FRAXIPURE EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS	109
4.1.1. Efectos sobre la presión arterial	109
4.1.2. Efectos sobre la diuresis	118
4.1.3. Efectos sobre el balance redox	125
4.2. RESULTADOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS TRATADAS CRONICAMENTE CON FRAXIPURE.....	129

4.2.2. Efectos sobre el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida.....	133
4.2.3. Efectos sobre el balance redox.....	142
4.2.4. Efecto sobre la relajación vascular endotelio dependiente de acetilcolina	152
5. DISCUSIÓN	159
6. CONCLUSIONES	185
7. BIBLIOGRAFÍA	189

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la pared arterial.....	23
Figura 2. Sistema renina-angiotensina. ECA: Enzima convertidora de angiotensina.....	27
Figura 3. Producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno por reducción del oxígeno molecular. Cl^- = ión cloro; Fe^{2+} = ión ferroso; Fe^{3+} = ión férrico; HClO = ácido hipocloroso; H_2O = agua; H_2O_2 = peróxido de hidrógeno; HOONO = ácido peroxinitroso; MPO = mieloperoxidasa; NO = óxido nítrico; NO_2 = dióxido de nitrógeno; O_2 = oxígeno; O_2^- = anión superóxido; OH^\bullet = radical hidroxilo; $^\bullet\text{OONO}$ = peroxinitrito; SOD = superóxido dismutasa.	29
Figura 4. Etapas necesarias para el desarrollo de alimentos funcionales.	40
Figura 5. Curva de respuesta en forma de J o de U invertida, que presentan los xenohorméticos, caracterizada por una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas.....	45
Figura 6. Esquema de la xenohormesis. LCA: ácido litocólico; DCA: ácido dicloroacético.	46
Figura 7. Estructura química del isopreno.	49
Figura 8. Ruta biosintética de los terpenos. AACoAS = Acetoacetil-CoA sintetasa; AcAcCoA = acetoacetil-CoA; AcCoA = Acetil Coenzima A; ADP = adenosin difosfato; ATP = adenosin trifosfato; DMAPP = pirofosfato de dimetilalilo; FPP farnesilpirofosfato; GGPP= pirofosfato de geranilgeranilo; GPP = geranil-pirofosfato; HMG-CoA = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; HMGCAR = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; HMGCAS = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; HSCoA = coenzima A; IPP = pirofosfato de isopentenilo; IPPI = difosfato de isopentenilo isomerasa; MEV = ácido mevalónico (3,5-dihidroxi-3-metilvaleriánico); MEVK = mevalonato quinasa; MEV-P = mevalonato fosforilado; MEV-PP = mevalonato bifosforilado; MDD = mevalonato 5-difosfato descarboxilasa; MVA = mevaldehído; PMK = fosfomevalonato quinasa; NADHP = nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADP^+ = NADHP oxidada.	51
Figura 9. Estructura de los iridoides.	52

Figura 10. Representaciones botánicas de <i>Olea europaea</i> L., <i>Harpagophytum procumbens</i> L., <i>Valeriana Officinalis</i> L., <i>Gentiana lutea</i> L. y <i>Morinda citrifolia</i> L.	54
Figura 11. Tahitian Noni™ Original. Bebidas bioactiva comercializada a partir del fruto del noni.	58
Figura 12. <i>Fraxinus excelsior</i> L. - Fresno común o fresno europeo.	59
Figura 13. Estructura química de la nuzenida (A) y del GI3 (B).	61
Figura 14. Localización geográfica de la especie vegetal, <i>Fraxinus excelsior</i> L., en el continente africano.	63
Figura 15. Esquema de la obtención de FraxiPure (FRP).	65
Figura 16. Esquema de la experimentación realizada con FraxiPure (FRP); Acr: Aclaramiento de creatinina; EVO: Excreción volumétrica de orina; GSH = Glutación reducido; MDA = Malonildialdehído; ORAC = Oxygen Radical Absorbance Capacity = Capacidad para absorber radicales libres de oxígeno; PAS = Presión arterial sistólica; SHR = Ratas espontáneamente hipertensas; WKY = Ratas Wistar-Kyoto.	79
Figura 17. Protocolo experimental para evaluar el efecto sobre la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), de ratas espontáneamente hipertensas, de la administración intragástrica de 1 ml de agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure.	82
Figura 18. Protocolo experimental para evaluar el efecto sobre la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), de ratas Wistar-Kyoto, de la administración intragástrica de 1 ml de agua (control negativo) o 20 mg/kg de FraxiPure.	83
Figura 19. Protocolo experimental para evaluar el efecto sobre la presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas, de la administración intragástrica de 10 mg/kg de Furosemida o de 1 mg/kg de Torasemida.	84
Figura 20. Representación esquemática de las distintas etapas para recolectar y medir el volumen de orina excretada por las ratas, y poder así calcular la excreción volumétrica de orina. A) Las ratas permanecen sin agua y comida durante 18 horas. B) Administración intragástrica del producto. C) Jaulas metabólicas en las que permanecen las ratas con comida y bebida a libre disposición durante 4 horas. D) Recolección de orina.	86
Figura 21. Protocolo experimental para determinar la capacidad antioxidante total del plasma y los niveles plasmáticos de malonildialdehído	

(MDA), de ratas espontáneamente hipertensas a las que administrábamos por vía intragástrica agua (control negativo), 50 mg/kg Captopril (control positivo) o 20 mg/kg de FraxiPure.	89
Figura 22. Protocolo experimental para evaluar el efecto de la administración crónica de FraxiPure (FRP) en ratas espontáneamente hipertensas....	92
Figura 23. Técnica del manguito en la cola, para la medida indirecta de la presión arterial en ratas (Buñag, 1973).	93
Figura 24. Extracción de sangre a la rata, de la vena yugular.	94
Figura 25. Sistema cobas 400 INTEGRA plus.	95
Figura 26. Analizador Roche/Hitachi MODULAR ANALYTICS.	98
Figura 27. Esquema de los baños de órganos utilizados para llevar a cabo los ensayos con anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas.	104
Figura 28. Esquema del protocolo para evaluar la respuesta endotelio dependiente de Acetilcolina en anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas.	105
Figura 29. Disminuciones de la presión arterial sistólica (PAS) (A) y de la presión arterial diastólica (PAD) (B) en ratas espontáneamente hipertensas, después de la administración intragástrica de agua (O), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 5 mg/kg (●), 10 mg/kg (●), 20 mg/kg (▲), 30 mg/kg (◆) y 40 mg/kg (◆). Los datos representan la media ± EEM para un mínimo de 8 animales. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni....	111
Figura 30. Modificación de la presión arterial sistólica (PAS) (A) y de la presión arterial diastólica (PAD) (B) producida en ratas Wistar-Kyoto, después de la administración intragástrica de agua (O) o 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (▲). Los datos representan la media ± EEM para un mínimo de 8 animales. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.	112
Figura 31. Disminución de la presión arterial sistólica (PAS) producida en ratas espontáneamente hipertensas, 4 horas después de la administración intragástrica de agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▤) o 1 mg/kg de Torasemida (▨). Los datos representan la media ± EEM para un mínimo de 8 animales. Letras iguales indican que no	

hay diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.....	117
Figura 32. Excreción volumétrica de orina (EVO) en ratas espontáneamente hipertensas, 4 horas después de administrar diferentes compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▤) o 1 mg/kg de Torasemida (▥). Los datos expresan la media \pm EEM, para un mínimo de 8 ratas. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.....	119
Figura 33. Fracción de excreción (FE) de sodio (FENa), cloro (FECl), potasio (FEK), calcio (FECa) y fosfato (FEP) en ratas espontáneamente hipertensas, después de administrar distintos compuestos; agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▤) o 1 mg/kg de Torasemida (▥). Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de las administraciones. Los datos representan la media \pm EEM para un mínimo de 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.....	120
Figura 34. Fracción de excreción de urea (FEU) y de ácido úrico (FEAU) en ratas espontáneamente hipertensas tratadas, por vía intragástrica, respectivamente, con los siguientes compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▤) o 1 mg/kg de Torasemida (▥). Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de administrar a las ratas los compuestos citados anteriormente. Los datos expresan la media \pm EEM, para un mínimo de 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.....	121
Figura 35. Aclaramiento de creatinina (Acr) en ratas espontáneamente hipertensas tratadas, por vía intragástrica, respectivamente, con los siguientes compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▤) o 1 mg/kg de Torasemida (▥). Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de administrar a las ratas los compuestos citados anteriormente. Los datos expresan la media \pm EEM, para un mínimo de 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.....	122

- Figura 36.** Fracción de excreción de sodio (FENa), cloro (FECl), potasio (FEK), calcio (FECa), fosfato (FEP), urea (FEU) y ácido úrico (FEAU), en ratas espontáneamente hipertensas, después de administrar a estos animales distintos compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (■) o 1 mg/kg de Torasemida (■). Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de las administraciones. Los datos representan la media \pm EEM, para un mínimo de 5 animales. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al grupo control negativo ($P < 0,05$). P se estimó utilizando un test de la T de Student para datos no apareados..... 123
- Figura 37.** Capacidad antioxidante del plasma de ratas espontáneamente hipertensas, expresada como la equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma, después de la administración intragástrica de diferentes productos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■) o 50 mg/kg Captopril (■). Los datos representan valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se observaron diferencias significativas entre todos los grupos ($P < 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni. 126
- Figura 38.** Concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) en ratas espontáneamente hipertensas, después de la administración intragástrica de diferentes productos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■) o 50 mg/kg Captopril (■). Los datos representan valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni. 127
- Figura 39.** Presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento = T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (período de retirada del tratamiento = R, representado por la barra vacía) todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni. 131
- Figura 40.** Peso corporal de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento = T,

representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (período de retirada del tratamiento = R, representado por la barra vacía) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media ± EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.....134

Figura 41. Ingesta sólida de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento = T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (período de retirada del tratamiento = R, representado por la barra vacía) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media ± EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.....137

Figura 42. Ingesta líquida de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento = T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida todas (período de retirada del tratamiento = R, representado por la barra vacía) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media ± EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.....140

Figura 43. Capacidad antioxidante del plasma de ratas espontáneamente hipertensas con 20 y 24 semanas de vida, expresada como la equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (■), 40 mg/kg (■) y 60 mg/kg (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media ± EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia

- significativa ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni..... 143
- Figura 44.** Concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) de ratas espontáneamente hipertensas con 20 y 24 semanas de vida. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (■), 40 mg/kg (■) y 60 mg/kg (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni. 145
- Figura 45.** Concentración de malonildialdehído (MDA) en tejido hepático de ratas espontáneamente hipertensas con 20 y 24 semanas de vida. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (■), 40 mg/kg (■) y 60 mg/kg (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni. 147
- Figura 46.** Concentración de glutatión reducido (GSH) en tejido hepático de ratas espontáneamente hipertensas con 20 y 24 semanas de vida. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (■), 40 mg/kg (■) y 60 mg/kg (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni..... 149
- Figura 47.** Curvas concentración-respuesta acumulativa de acetilcolina (ACh) en anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (A) y 24 (B) semanas de vida. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (O), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis

de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.153

Índice de Tablas

Página

Tabla 1. Clasificación de la hipertensión arterial según la Guía Europea SEH/SEC de 2013 (Mancia et al., 2013).....	19
Tabla 2. Clasificación de los diuréticos que pueden utilizarse en pacientes hipertensos o edematosos según su sitio primario de acción.	35
Tabla 3. Principales fitoquímicos y sus principales propiedades beneficiosas sobre la salud.....	48
Tabla 4. Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) de ratas espontáneamente hipertensas, en distintos momentos después de la administración de agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales.....	113
Tabla 5. Valores de presión arterial diastólica (PAD) (mm Hg) de ratas espontáneamente hipertensas, en distintos momentos después de la administración de agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales.....	114
Tabla 6. Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) de ratas Wistar-Kyoto, en distintos momentos después de la administración de agua o 20 mg/kg de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales.....	115
Tabla 7. Aclaramiento de creatinina (Acr) y fracción de excreción de sodio (FENa), cloro (FECl), potasio (FEK), calcio (FECa), fosfato (FEP), urea (FEU) y ácido úrico (FEAU) en ratas espontáneamente hipertensas, después de administrar distintos compuestos: agua, 20 mg/kg de FraxiPure (FRP), 50 mg/kg de Captopril, 10 mg/kg de Furosemida o 1 mg/kg de Torasemida. Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de las administraciones. Los datos expresan la media \pm EEM, para un mínimo de 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.....	124
Tabla 8. Valores de la capacidad antioxidante del plasma, expresada como la equivalencia en μ mol de TROLOX/ml plasma, y de la concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) de ratas espontáneamente	

hipertensas, después de administrar diferentes productos: agua, 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) o 50 mg/kg Captopril. Los datos representan valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.128

Tabla 9. Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) de ratas espontáneamente hipertensas tratadas diariamente con 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los tratamientos en los distintos grupos se mantuvieron hasta las 20 semanas de vida, y a partir de este momento todas las ratas ingerían agua. Los valores representan la media \pm EEM para 10 animales hasta las 20 semanas de vida, y para 5 animales desde las 21 hasta las 24 semanas de vida. Estos últimos valores corresponden a medidas obtenidas después de retirar los tratamientos.132

Tabla 10. Valores del peso corporal en gramos (g) de ratas espontáneamente hipertensas en distintos momentos durante la administración diaria de agua, 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para 10 animales hasta las 20 semanas de vida y para 5 animales desde las 21 hasta las 24 semanas de vida. Estos últimos valores corresponden a medidas obtenidas después de retirar los tratamientos.135

Tabla 11. Valores semanales de ingesta sólida (g/rata/día) de ratas espontáneamente hipertensas, a las que se administraba diariamente agua, 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para 10 animales hasta las 20 semanas de vida y para 5 animales desde las 21 hasta las 24 semanas de vida. Estos últimos valores corresponden a medidas obtenidas después de retirar los tratamientos.138

Tabla 12. Valores semanales de ingesta líquida (ml/rata/día) de ratas espontáneamente hipertensas, a las que se administraba diariamente agua, 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para 10 animales hasta las 20 semanas de vida y para 5 animales desde las 21 hasta las 24 semanas de vida. Estos últimos valores corresponden a medidas obtenidas después de retirar los tratamientos.141

Tabla 13. Capacidad antioxidante del plasma, medida como capacidad de este fluido biológico para absorber radicales libres de oxígeno y expresada como la equivalencia en μ mol de TROLOX/ml plasma,

concentración plasmática y hepática de malonildialdehído (MDA), y concentración hepática de glutatión reducido (GSH), de ratas espontáneamente hipertensas con 20 semanas de vida. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento) las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni..... 150

Tabla 14. Capacidad antioxidante del plasma, medida como capacidad de este fluido biológico para absorber radicales libres de oxígeno y expresada como la equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma, concentración plasmática y hepática de malonildialdehído (MDA), y concentración hepática de glutatión reducido (GSH) de ratas espontáneamente hipertensas con 24 semanas de vida. Durante el período comprendido entre la semana 5 y la semana 20 de vida, las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Sin embargo, a partir de la semana 20 de vida, todas las ratas ingerían agua. Los valores representan la media \pm EEM para 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni..... 151

Tabla 15. Valores de la relajación provocada por acetilcolina (ACh) en anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas con 20 semanas de vida. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento) las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 5 ensayos homogéneos, y cada uno de los anillos utilizados para estos ensayos procedía de un animal distinto..... 154

Tabla 16. Valores de la relajación provocada por acetilcolina (ACh) en anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas con 24 semanas de vida. Durante el período comprendido entre la semana 5 y la semana 20 de vida, las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Sin embargo, a partir de la semana 20 de vida, todas las ratas ingerían agua. Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 5 ensayos homogéneos, y cada uno de los anillos utilizados para estos ensayos procedía de un animal distinto.... 155

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Lista de abreviaturas y símbolos

AACoAS	Acetoacetil-coenzima A sintetasa
AcAcCoA	Acetoacetil-coenzima A
AcCoA	Acetil coenzima A
Ach	Acetilcolina
Acr	Aclaramiento de creatinina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
ANOVA	Análisis de varianza
APPH	2-2'-Azobis-(2-metilpropionamida)
ARA II	Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II
AT1	Receptores de angiotensina de tipo 1
AT2	Receptores de angiotensina de tipo 2
ATP	Adenosin trifosfato
CAT	Catalasa
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
Cl ⁻	Ión cloro
DAA	Ácido deacetilasperuideo
DCA	Ácido dicloroacético
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
ECA	Enzima Convertidora de la Angiotensina
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error Estándar de la Media
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fe ²⁺	Ión ferroso

Fe ³⁺	Ión férrico
FE	Fracción de Excreción
FEAU	Fracción de Excreción de ácido úrico
FECI	Fracción de Excreción de cloro
FENa	Fracción de Excreción de sodio
FEP	Fracción de Excreción de fosfato
FEU	Fracción de Excreción de urea
FPP	Farnesilpirofosfato
FRP	FraxiPure™
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranilo
GLDH	Glutación deshidrogenasa
GPP	Geranil-pirofosfato
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación S-transferasa
H ⁺	Ión hidrógeno
HCIO	Ácido hipocloro
HMG-CoA	Hidroxi-Metil-Glutaril Coenzima A
HMG-CoAR	Hidroxi-Metil-Glutaril Coenzima A reductasa
HMG-CoAS	Hidroxi-Metil-Glutaril Coenzima A sintasa
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno (agua oxigenada)
HOONO	Ácido peroxinitroso
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
IECA	Inhibidor de la Enzima Convertidora de la Angiotensina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
IPPI	Difosfato de isopentenilo isomerasa
ISE	Electrodo selectivo de iones (Ion Selective Electrode)
K ⁺	Ión potasio
LCA	Ácido litocólico

L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
MAO	Monoaminooxidasa
MDA	Malonildialdehído
MDD	Mevalonato 5-difosfato descarboxilasa
MEV	Ácido mevalónico
MEVK	Mevalonato quinasa
MEV-P	Mevalonato fosforilado
MEV-PP	Mevalonato bifosforilado
MPO	Mieloperoxidasa
MVA	Mevaldehído
Na ⁺	Ión sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NM-BAPTA	5-nitro-5'-metil-BAPTA
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
NOS	Óxido nítrico sintasa
O ₂	Oxígeno
¹ O ₂	Oxígeno singlete
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
⁻ OONO	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PAD	Presión Arterial Diastólica
PAS	Presión Arterial Sistólica
PBS	Tampón fosfato

PGI ₂	Prostaciclina
PMK	Fosfomevalonato quinasa
POD	Peroxidasa
PPAR- α	Proliferadores de peroxisomas tipo α
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEC	Sociedad Europea de Cardiología
SEH	Sociedad Europea de Hipertensión
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TOOS	N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WKY	Ratas Wistar Kyoto

RESUMEN

RESUMEN

Los fitoquímicos son sustancias con actividad biológica que se encuentran en las plantas. Estos compuestos pueden incluirse en alimentos que se denominan alimentos funcionales, porque mejoran la salud de los consumidores. Algunos de estos alimentos se utilizan para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión, una patología clave en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

En la presente Tesis Doctoral, hemos estudiado el efecto de un extracto de fresno común, denominado FraxiPure (FRP), que contiene fitoquímicos terpénicos y fenólicos, sobre la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Estos animales son un modelo experimental de hipertensión muy utilizado, ya que el desarrollo de la hipertensión en ellos presenta muchas similitudes con el desarrollo de la hipertensión esencial en humanos.

Se administraron, por vía intragástrica, distintas dosis de FRP (5, 10, 20, 30 y 40 mg/kg), disueltas en 1 ml de agua, a ratas SHR con 17-20 semanas de vida, que pesaban 310-320 g, y se evaluaron las correspondientes modificaciones de la presión arterial. Para estos ensayos, se usó agua como control negativo, y 50 mg/kg de Captopril como control positivo. Se midió la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) de las ratas, mediante la técnica del manguito en la cola, antes de la administración, y también 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas post-administración. FRP disminuyó la presión arterial de las ratas, aunque menos que Captopril, y la disminución máxima de la PAS que ocasionó este extracto ($-26,88 \pm 3,05$ mm Hg) la observamos 4 horas después de administrar 20 mg/kg del mismo.

Esta dosis del extracto no modificó sin embargo la PAS de las ratas Wistar-Kyoto, que son el control normotenso de las ratas SHR. FRP también disminuyó la PAD de las ratas SHR, y la disminución máxima de esta variable se observó 4 horas después de administrar 30 mg/kg del extracto ($-39,16 \pm 12,1$ mm Hg).

Sorprendentemente, el efecto de FRP sobre la PAS y la PAD, no

aumentaba al incrementar las dosis por encima de los valores señalados. Nuestro grupo de investigación ha observado una paradoja semejante cuando evaluaba el efecto de otros productos que también contenían fitoquímicos, en ratas SHR.

El reglamento relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos (REGLAMENTO (CE) Nº 1924/2006 DEL PARLAMENTO Y DEL CONSEJO EUROPEO) no sólo establece que es necesario demostrar las propiedades funcionales alegadas. Este reglamento también sugiere que se estudien los mecanismos de acción implicados en los efectos demostrados. Por ello, en esta Tesis Doctoral, también intentamos dilucidar el mecanismo, o los mecanismos, implicados en el efecto antihipertensivo de FRP, en las ratas SHR.

Otros investigadores han podido comprobar que un extracto de semillas de fresno, parecido al que se investiga en esta Tesis Doctoral, tiene efecto diurético en ratas SHR. Los diuréticos siempre han ocupado un lugar relevante en la terapéutica antihipertensiva y, por estos motivos, se evaluó el posible efecto diurético de FRP en ratas SHR de 17-20 semanas de vida. En estas ratas, también se evaluó el efecto diurético de Captopril (control antihipertensivo positivo) y el efecto diurético de Furosemida y Torasemida, dos fármacos muy eficaces que inhiben el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Para estos ensayos, las ratas permanecían durante 18 horas sin comer ni beber, y después se repartían en 5 grupos, que recibían por vía intragástrica, respectivamente, los siguientes productos: 1 ml de agua (control negativo), 20 mg/kg de FRP, 1 mg/kg de Torasemida, 10 mg/kg de Furosemida o 50 mg/kg de Captopril. Después de las distintas administraciones, las ratas se colocaban en jaulas metabólicas individuales. Se recolectó y midió el volumen de orina excretada durante 4 horas, calculándose a continuación la excreción volumétrica de orina (EVO), mediante la siguiente fórmula: $\text{EVO} = \text{Volumen de orina recolectado} \times 100 / \text{Volumen de líquido ingerido}$. Tras recolectar la orina, se extrajeron muestras de sangre en los animales, para determinaciones cuantitativas de distintos iones (Na^+ , Cl^- y K^+), y también de calcio y fosfatos,

y de distintos metabolitos (creatinina, urea y ácido úrico). Se calculó posteriormente el aclaramiento de creatinina (Acr) y también la fracción de excreción (FE) de los restantes analitos, mediante la siguiente fórmula:
$$\frac{[\text{producto}] \text{ orina} \times [\text{creatinina}] \text{ plasma} \times 100}{[\text{producto}] \text{ plasma} \times [\text{creatinina}] \text{ orina}}$$
 Este parámetro refleja el porcentaje de lo que se filtra por el riñón que se excreta en la orina. La EVO fue mayor en el grupo de ratas SHR tratadas con Torasemida, que en el grupo de ratas control negativo. La Torasemida aumentó significativamente la FE de sodio (FENa), cloro (FECl) y ácido úrico (FEAU) en las ratas SHR. FRP aumentó también significativamente la EVO y causó un ligero aumento de la FENa y la FECl en las ratas. Por el contrario, FRP disminuyó significativamente la FE de potasio (FEK) y de fosfato (FEP) en las ratas SHR, y produjo una ligera disminución en la FE de calcio (FECa) en estos animales, pero no modificó en ellos la FEAU. Captopril no modificó la EVO, pero aumentó algo la FENa y la FECl de las ratas SHR. Todos estos parámetros aumentaron muy poco con Furosemida, pero este fármaco disminuyó ligeramente la FEK y la FEP. No se observaron diferencias entre los valores del Acr y de la FE de urea (FEU) del grupo control negativo, y los valores correspondientes en los restantes grupos de ratas SHR.

Se realizaron además medidas de la PAS en las ratas SHR 4 horas después de la administración de 1 mg/kg de Torasemida, y 4 horas después de la administración de 10 mg/kg de Furosemida. Pudimos de este modo comprobar que, con este margen post-administración, el efecto antihipertensivo de 20 mg/kg de FRP en las ratas, era comparable al efecto antihipertensivo de 1 mg/kg de Torasemida. Con este margen post-administración, el efecto antihipertensivo de esta dosis del extracto resultó además mucho mayor que el efecto antihipertensivo de 10 mg/kg de Furosemida.

En esta Tesis Doctoral, se estudiaron además los posibles efectos antioxidantes de FRP en las ratas SHR, pues la hipertensión se ha asociado con un incremento del estrés oxidativo y se sabe que los componentes mayoritarios de FRP (nuzenida y GI3) tienen propiedades antioxidantes. Pudimos comprobar que la administración, por vía intragástrica, de 20 mg/kg

de FRP, ocasionaba un aumento de la capacidad antioxidante del plasma de estas ratas, medida como capacidad de este fluido biológico para absorber radicales libres de oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity = ORAC). El malonildialdehído (MDA) es un metabolito que se produce como consecuencia de la peroxidación lipídica, y también se midió este compuesto en el plasma de las ratas SHR tratadas con 20 mg/kg de FRP. Para ello, se utilizó la técnica del ácido 2-tiobarbitúrico. Pudimos comprobar que el tratamiento citado había producido una disminución de MDA en las muestras de plasma.

La hipertensión es una patología crónica que requiere tratamiento continuado. Por eso, nos pareció que en esta Tesis Doctoral resultaba imprescindible un estudio en el que se administrase FRP a las ratas SHR durante un período prolongado de tiempo. Para este estudio, se utilizaron 5 grupos de ratas macho recién destetadas con 4 semanas de vida, que ingerían respectivamente y hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento), los siguientes productos: agua (control negativo), 50 mg/kg/día de Captopril (control positivo) o distintas dosis de FRP (20 mg/kg/día, 40 mg/kg/día y 60 mg/kg/día). Todos estos productos se disolvían en el agua de bebida y las ratas los ingerían *ad libitum* en el biberón. Al finalizar el período de tratamiento, se sacrificaron por decapitación 5 ratas de cada grupo, y se obtuvieron muestras de sangre y muestras de hígado en estos animales, para realizar determinaciones de ORAC, MDA y glutatión reducido (GSH). También se extrajeron las aortas de estos animales, para montar anillos de este tejido en baños de órganos tradicionales, y evaluar la respuesta endotelio dependiente de acetilcolina en estas preparaciones. En todos los grupos, los restantes animales permanecieron 4 semanas más ingiriendo agua. Al final de este período (período de retirada del tratamiento), se sacrificaron también por decapitación, y se llevaron a cabo en ellos las mismas determinaciones y los mismos ensayos realizados en los animales que se habían sacrificado anteriormente. En este estudio de administración crónica, se realizaron medidas semanales de la PAS, desde que las ratas tenían 6 semanas de vida, hasta que finalizó el período experimental.

Para obtener estas medidas, se utilizó también la técnica del manguito en la cola. Se controló además semanalmente el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de las ratas durante todo el período experimental. A lo largo del período de tratamiento, los valores de la PAS fueron siempre menores en las ratas de los grupos que ingerían FRP, que en las ratas del grupo que ingería agua, pero la administración continuada de 50 mg/kg/día de Captopril ocasionó un descenso de la PAS aún mayor que el producido por FRP. El ORAC de los animales tratados diariamente con 20 mg/kg o 40 mg/kg de FRP fue mayor que el ORAC de los animales del grupo control negativo, y la concentración de MDA en el plasma y en el hígado de las ratas SHR que se habían tratado con las distintas dosis de FRP o con Captopril, fueron menores que la concentración de este metabolito en el plasma y el hígado de las ratas que ingerían agua. No se apreciaron diferencias significativas entre los valores hepáticos de GSH de las ratas de los distintos grupos, pero los valores de este antioxidante fueron algo más altos en el hígado de las ratas tratadas con 20 mg/kg o 40 mg/kg de FRP y fueron paradójicamente algo más bajos en las tratadas con 60 mg/kg del extracto.

La retirada de los tratamientos ocasionó una reversión del efecto sobre la presión arterial. La reversión fue total tras la retirada de las distintas dosis de FRP, pero fue parcial cuando se retiró el tratamiento con 50 mg/kg/día de Captopril. Los efectos de FRP sobre el ORAC y sobre los niveles hepáticos de MDA también desaparecieron usualmente al retirar los tratamientos. Sin embargo, el grupo de ratas SHR que se habían tratado diariamente con 20 mg/kg de FRP, mantuvo niveles plasmáticos de MDA más bajos que los de los animales del grupo control negativo, 4 semanas después de retirar este tratamiento.

Hay además que resaltar que el tratamiento continuado con las dosis más altas de FRP (40 mg/kg y 60 mg/kg) ocasionó un incremento del peso corporal en las ratas SHR. La ingesta sólida de los animales tratados con estas dosis del extracto también fue mayor. La ingesta líquida fue muy variable en todos los grupos, pero disminuyó en los grupos de ratas tratadas con el extracto y aumentó en el grupo que bebía la solución de Captopril.

La relajación provocada por acetilcolina en las aortas de los animales tratados con FRP o Captopril, fue siempre mayor que la relajación provocada por este agente en las aortas de los animales que habían ingerido agua. Este incremento en la respuesta de acetilcolina también se apreció en las aortas de las ratas a las que habíamos retirado 4 semanas antes el tratamiento con estos productos.

Podemos concluir que FRP tiene efecto antihipertensivo en ratas SHR, y favorece la respuesta endotelial de estos animales. Su comportamiento como diurético ahorrador de potasio y la disminución del estrés oxidativo que ocasiona, podrían justificar estos efectos en las ratas, estando su bioactividad posiblemente relacionada con los compuestos fenólicos y los secoiridoides que contiene. Su buena potencia antihipertensiva, y el efecto suave, pero mantenido, que ocasiona sobre la PAS de las ratas SHR, sugieren que este extracto podría incluirse como ingrediente en algún alimento funcional, útil para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión. Cabe señalar que, aunque algunos estudios recientes en voluntarios sanos han demostrado ya la seguridad y tolerabilidad de FRP para el consumo humano, antes de utilizar este extracto como ingrediente de un alimento funcional antihipertensivo, deberán realizarse estudios que demuestren su eficacia en pacientes hipertensos. Antes de su utilización comercial como ingrediente de un alimento funcional, se deberían estudiar además las posibles propiedades orexigénicas de este extracto.

SUMMARY

SUMMARY

Phytochemicals are biologically active compounds that are present in plants. They may be included in functional foods that improve health of consumers. Some of these foods are used for the prevention and/or the treatment of hypertension, a key pathology in the development of cardiovascular diseases.

In this Doctoral Thesis, we have studied the effect of a *Fraxinus excelsior* L. seed extract, named FraxiPure (FRP), that contains terpene and phenolic phytochemicals, on spontaneously hypertensive rats (SHR). These animals are a well known experimental model for hypertension, because the development of this disease in this strain is very similar to the development of essential hypertension in humans.

Different doses of FRP (5, 10, 20, 30 and 40 mg/kg), always dissolved in 1 ml of water, were administered, by intragastric intubation, to 17-22-week-old male SHR (300-350 g). Distilled water was used as negative control and 50 mg/kg Captopril was used as positive control. The systolic blood pressure (SBP) and the diastolic blood pressure (DBP) were recorded by the tail cuff method in the rats, before administration and also at different moments post-administration (2, 4, 6, 8, 24 and 48 hours). Captopril decreased arterial blood pressure in the SHR. FRP also decreased arterial blood pressure in these animals, but the effect of this extract was always less accentuated than the effect of Captopril. The most effective dose of FRP to decrease SBP in the SHR was 20 mg/kg. This dose of FRP caused in this strain the maximum decrease in SBP (-26.88 ± 3.05 mm Hg) 4 hours post-intragastric administration. Nevertheless, the same dose of the extract did not modify SBP in Wistar-Kyoto rats, that are considered as the normotensive control for the SHR. FRP decreased also DBP in the SHR. The maximum decrease in this variable (-39.16 ± 12.1 mm Hg) was observed 4 hours post-administration of 30 mg/kg FRP. Surprisingly, higher doses of FRP decreased less SBP and DBP in the SHR. Our research group have observed a similar paradox when we evaluated the effect of other products

containing also phytochemicals, in SHR.

According to the REGULATION ON THE USE OF NUTRITION AND HEALTH CLAIMS FOR FOODS (EC) Nº 1924/2006, OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL (20 December 2006), it is important to demonstrate the biological properties that have been claimed for functional foods. Moreover, according to this regulation, it is also advisable to elucidate the mechanisms that can justify these claims. Therefore, in this Doctoral Thesis, we also studied the mechanisms that could be implicated in the antihypertensive effect of FRP in SHR.

Some researchers reported a diuretic effect in SHR for a *Fraxinus excelsior* L. seed extract similar to FRP, and we must not forget that, since the introduction in therapy of diuretics, these drugs represent the first step for antihypertensive treatment. For all these reasons, we evaluated the possible diuretic effect of FRP in SHR. The possible diuretic effect of Captopril (positive antihypertensive control), Furosemide and Torasemide (two drugs that are considered inhibitors of the cotransporter $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ in the thick ascending limb of Henle's loop) were also evaluated in these animals. In order to carry out these trials, 17-20-week-old male SHR were fasted for 18 hour, and these animals were afterwards administered by gastric intubation the following products: water (1 ml), 20 mg/kg FRP, 50 mg/kg Captopril, 1 mg/kg Torasemide or 10 mg/kg Furosemide. The rats were individually housed in metabolic cages immediately after these administrations, and urine was collected for 4 hours in order to obtain the urine volumetric excretion (UVE). This parameter was calculated according to the following formula: $\text{urine volume collected} \times 100 / \text{volume of liquid intake}$. Blood samples were obtained in the animals from the different groups, just after collecting the urine. The concentration of different ions (Na^+ , Cl^- , K^+), calcium, phosphate and metabolites (creatinine, urea and uric acid) were investigated in the urine samples, and the same quantitative determinations were carried out in the plasma samples. Creatinine clearance (Ccr) was calculated, and the fractional excretion (FE) for the ions and mentioned analytes were also obtained. FE was calculated according to the following formula: [product]

urine x [creatinine] plasma x 100 / [product] plasma x [creatinine] urine. This parameter reflects the percentage of the filtered product excreted in the urine. UVE was higher in the Torasemide treated SHR than in the control animals. In addition, Torasemide significantly increased FE of sodium (FENa), chloride (FECl) and uric acid (FEUA) in SHR. FRP significantly increased UVE and caused also a slight increase in FENa and FECl in the rats. On the contrary, FRP significantly decreased the FE of potassium (FEK) and phosphate (FEP) in the SHR, and decreased somewhat the FE of calcium (FECa) in these animals, but FEUA was very similar in the FRP and water groups. UVE values in the Captopril treated rats showed no significant differences when compared with the corresponding value in the negative control group, but this drug increased somewhat FENa and FECl in the SHR. Furosemide has scarce effect in all the parameters mentioned above, but this drug decreased somewhat FEK and FEP. In addition, no significant differences existed between the Ccr and the FE of urea (FEU) of the water group and the corresponding values in the other different groups of SHR.

We measured SBP in the SHR 4 hours after administration of 1 mg/kg of Torasemide, and also 4 hours after administration of 10 mg/kg Furosemide. Thus, it was found that, at least at this moment post-administration, the antihypertensive effect of 20 mg/kg of FRP was quite similar to the antihypertensive effect of 1 mg/kg of Torasemide in the SHR. In addition, at this moment post-administration, the antihypertensive effect of this dose of the extract was clearly greater than the antihypertensive effect of 10 mg/kg Furosemide.

Since elevated blood pressure is associated with increased oxidative stress, in this Doctoral Thesis we also studied the possible antioxidant properties of FRP in SHR. Intragastric administration of 20 mg/kg FRP increased plasma antioxidant capacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity = ORAC) in these rats. Malondialdehyde (MDA), a metabolite derived from the lipid peroxidative process, was also measured in the plasma of these animals, by the thiobarbituric acid technique. The dose of 20 mg/kg FRP significantly decreased plasma MDA in SHR.

Hypertension is a chronic pathology that requires chronic treatment. Therefore, we also studied the long-term effect of FRP in SHR. For this study, we used 4-week-old male SHR. These animals were caged after being weaned in groups of 5 animals. They were in turn divided into five groups of 10 animals, that respectively consumed (with *ad libitum* intake in the drinking fluid), until the 20th week of life (treatment period), the following products: tap water (negative control), 50 mg/kg/day Captopril (positive control) or different doses of FRP (20 mg/kg/day, 40 mg/kg/day and 60 mg/kg/day). At the end of the treatment period, five 20-week-old rats of each group were sacrificed by decapitation. Blood and liver samples were collected in these animals. ORAC and MDA were measured in the plasma samples. Liver MDA and reduced glutathione (GSH) were also determined. Moreover, the thoraxes of the sacrificed rats were opened, and the aorta was quickly extracted to evaluate the endothelium-dependent response to acetylcholine in aorta ring preparations. The drinking fluid was tap water for all the rats from the 20th to the 24th week of life (follow-up period). At the end of this period, all the rats were sacrificed by decapitation, and the same determinations and procedures took place in these animals as for the sacrificed 20-week-old rats. SBP was measured weekly in the rats by the tail cuff method, from the 6th to 24th week of life. In addition, body weight gain, solid and liquid intakes were weekly recorded in the animals throughout the experimental period. SBP decreased in the FRP treated rats, but the administration of 50 mg/kg/day Captopril caused a more marked decrease in SBP in the SHR. Plasma ORAC values were higher in the 20-week-old rats that had been treated with 20 mg/kg/day FRP or 40 mg/kg/day FRP, than in the corresponding negative control rats. In addition, plasma and liver MDA decreased in the 20-week-old rats that had been treated with the different doses of FRP, or with Captopril. No significant differences were observed between the liver GSH values of the treated rats, and the corresponding values in the negative control group. In any case, liver GSH was somewhat higher in the rats that had been treated with 20 mg/kg/day FRP or 40 mg/kg/day FRP, than in the rats of the negative control group, and, paradoxically, liver GSH was quite lower in the rats that

had been treated with 60 mg/kg/day FRP, than in the rats of the negative control group.

Arterial blood pressure rose gradually in the rats that had ingested FRP or 50 mg/kg/day Captopril, when these treatments were removed. A total reversion of the antihypertensive effect was observed in the groups of SHR that had been treated with FRP, but only a partial reversion was observed in the group of SHR that has been treated with 50 mg/kg/day Captopril. After withdrawal of FRP, plasma ORAC and liver MDA also returned to control values. However, 4 weeks after removal 20 mg/kg/day FRP, plasma MDA levels remained still lower than the corresponding control values.

The animals long-term treated with high doses of FRP (40 mg/kg/day or 60 mg/kg/day) showed an increase in body weight gain. Solid intake of the animals treated with these doses of the extract also increased. Liquid intake was very variable in all groups of rats, but decreased in the groups that received long-term treatment with FRP, and increased in the group treated with 50 mg/kg/day Captopril.

Acetylcholine relaxation was always greater in the aorta preparations from the rats that had been treated with FRP or Captopril, than in the aorta preparations from the rats that had drunk tap water. Four weeks after removing these treatments, the increase in acetylcholine response was still observed.

We can conclude that FRP has antihypertensive effect in SHR. This extract behaves as a potassium-sparing diuretic and decreases oxidative stress in these animals. Moreover, FRP improves endothelial response in SHR. All this, could justify the effect of FRP on arterial blood pressure. The bioactivity of this extract may be associated with its phenolic and secoiridoid content. The good antihypertensive potency of FRP, and the slight and maintained effect produced by this extract on the SBP of the SHR, suggests that it could be used as a functional food ingredient with potential therapeutic benefits in the prevention and treatment of hypertension. It should be noted that some recent studies, carried out in healthy volunteers, have already

demonstrated the safety and tolerability of FRP for human consumption. Nevertheless, before using this extract as an antihypertensive functional food ingredient, it should be also necessary to demonstrate its efficiency in hypertensive patients. We are also aware that before using FRP as a functional food ingredient, the potential orexigenic properties of this extract should be studied.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre que bombea el corazón sobre las arterias. La hipertensión arterial es, por consiguiente, el aumento de esta fuerza o presión arterial por encima de los valores normales, pudiendo aumentar tanto la presión arterial sistólica (PAS) como la presión arterial diastólica (PAD). Un comité formado por expertos pertenecientes a la Sociedad Europea de Hipertensión (SEH) y a la Sociedad Europea de Cardiología (SEC), ha publicado recientemente en la Guía Europea SEH/SEC de 2013 una clasificación de la hipertensión en función de los valores de la PAS y la PAD cuando estas variables se miden en mm Hg. Esta clasificación se describe a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la hipertensión arterial según la Guía Europea SEH/SEC de 2013 (Mancia et al., 2013).

CATEGORIA	SISTÓLICA		DIASTÓLICA
Óptima	<120	Y	<80
Normal	120-129	y/o	80-84
Normal Alta	130-139	y/o	85-89
Hipertensión Grado 1	140-159	y/o	90-99
Hipertensión Grado 2	160-179	y/o	100-109
Hipertensión Grado 3	≥180	y/o	≥110
Hipertensión Sistólica Aislada ♦	≥140	y	<90

- ♦ La hipertensión sistólica aislada debe clasificarse en grados (1, 2, 3) según las cifras de presión arterial sistólica en los rangos indicados.

PAS = Presión arterial sistólica; PAD = Presión arterial diastólica; SEC = Sociedad Europea de Cardiología; SEH = Sociedad Europea de Hipertensión.

Según la tabla anterior, cifras de 140 mm Hg para la PAS y de 90 mm Hg para la PAD se consideran el límite que define la hipertensión. Es importante además señalar, que en pacientes con diabetes, enfermedad renal crónica o enfermedad cardiovascular, los límites de la PAS y de la PAD para definir la hipertensión deberán ser más estrictos (PAS = 130 mm Hg, y PAD = 80 mm Hg).

La hipertensión arterial puede clasificarse en hipertensión primaria o esencial, e hipertensión secundaria. La hipertensión arterial esencial tiene un origen desconocido. Es la hipertensión con mayor incidencia en la población, y la padecen alrededor del 90-95% de los pacientes hipertensos observados en la clínica. Existen diversos aspectos fisiopatológicos que la caracterizan, como son la disfunción endotelial (Swales, 1995) y el remodelado de la pared de las arterias de resistencia (Folkow, 1990; Mulvany, 1994). La hipertensión esencial se considera una enfermedad de origen multifactorial que se desarrolla como resultado de complejas interacciones entre diferentes genes susceptibles, muchos de ellos aún desconocidos, y factores ambientales concretos. Los factores genéticos como la edad, la genética, el género o la raza no son controlables, pero sin embargo se conocen diferentes factores ambientales fácilmente controlables que afectan al desarrollo de esta enfermedad. Entre ellos, la dieta con alto contenido en sodio, el tabaquismo, el consumo de alcohol, el sedentarismo y el estrés ambiental.

La hipertensión secundaria tiene, por el contrario, una etiología conocida y la padece un escaso número de pacientes hipertensos (entre un 5% y un 10%). Se puede atribuir a la existencia de enfermedades renales, al estrechamiento de la aorta, o a anomalías en la secreción de diversas hormonas.

La hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular, y no hay que olvidar que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2005 murieron 17,5 millones de personas por enfermedad cardiovascular, lo

que representó un 30% de todas las muertes registradas en el mundo. Se calcula que en 2015 morirán cerca de 20 millones de personas en el mundo por enfermedad cardiovascular. Estas enfermedades son asimismo la primera causa de muerte en nuestro país. En España, además, la incidencia de hipertensión es muy elevada. En la población adulta alcanza cifras del 35%, y esta cifra aumenta hasta el 40% en edades medias y hasta el 68% en adultos mayores de 65 años (Banegas et al., 2005). Por otra parte, aunque la detección, control y tratamiento de la hipertensión arterial son fáciles, en 2004 se estimó que solo entre un 5% y un 10% de los pacientes hipertensos recibía un tratamiento adecuado (Wolf-Maier et al., 2004). Estas cifras pueden haber mejorado desde entonces, pero, en el momento actual, muchos pacientes hipertensos siguen sin tener bien controlada su presión arterial. Las nuevas guías resaltan además la necesidad de tener en cuenta el denominado "riesgo cardiovascular global" para el tratamiento de la hipertensión arterial. Por ello, además de las cifras aisladas de presión arterial, es importante detectar en el paciente la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular, pues la gran mayoría de los pacientes hipertensos presentan también dislipemias, obesidad, y diabetes.

1.2. PRINCIPALES FACTORES Y MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Existen varios factores que controlan los niveles de presión arterial en el organismo. Los cambios en la reactividad del músculo liso vascular se consideran como uno de los posibles mecanismos de acción implicados en la aparición de hipertensión arterial. Se sabe también que el endotelio vascular juega un papel esencial en la regulación del flujo sanguíneo y en el mantenimiento del tono vascular mediante la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores (Siddiqui y Hussain, 2007). Es importante asimismo recordar que el sistema renina-angiotensina ejerce un importante control sobre el tono arterial, y no hay que olvidar tampoco que la homeostasis vascular se regula a través del estado redox del organismo. A continuación comentaremos más ampliamente estas cuestiones.

1.2.1. Músculo liso vascular y endotelio

La pared de las arterias está constituida por tres capas perfectamente diferenciadas morfológicamente: íntima (o endotelio), media y adventicia. El endotelio y la capa media están separadas por la lámina elástica interna y, a su vez, la capa media y la adventicia están separadas por la lámina elástica externa (Rhodin, 1978) (Figura 1).

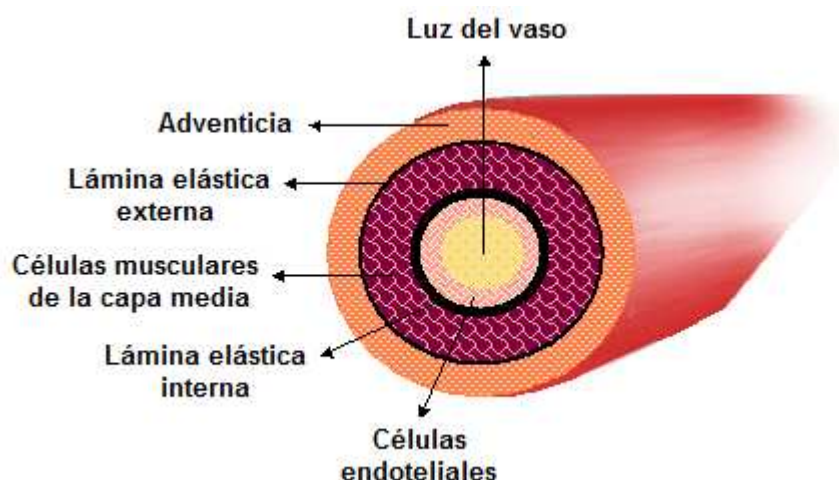


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la pared arterial.

La capa media está formada principalmente por músculo liso y actúa como sistema efector de la contracción y la relajación vascular. Existen diferentes hormonas y mediadores químicos capaces de estimular la contracción de la musculatura lisa, pero las sustancias efectoras más importantes y relevantes para la contracción del músculo liso vascular son la noradrenalina, la angiotensina II y la endotelina-1.

Los receptores adrenérgicos son una clase de receptores acoplados a la proteína G que son dianas de las catecolaminas, especialmente noradrenalina y adrenalina. En 1948, el científico estadounidense Raymond P. Ahlquist, clasificó los receptores adrenérgicos en dos subgrupos principales, α y β , basándose en la distinta sensibilidad de los compuestos en estudio (Ahlquist, 1948). Los que primero se estudiaron fueron los receptores β , debido a los efectos terapéuticos tan importantes que mostraron los β -bloqueantes sobre la hipertensión, angina de pecho e isquemia de miocardio; y debido también al beneficio que los β -estimulantes aportaron en la terapéutica antiasmática (Lands et al., 1967). Estos receptores se subdividieron en β_1 y β_2 , según su localización en el tejido

cardíaco o en el músculo liso y células glandulares, respectivamente. Más tarde, la identificación del gen que codifica el receptor β_3 , ayudó a interpretar los resultados de experimentos farmacológicos en los que se identificaron efectos atípicos de las catecolaminas, que eran diferentes de los observados tras la activación de los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 (Arch et al., 1984). Los receptores adrenérgicos α se clasifican en dos subtipos principales, α_1 y α_2 . Los receptores α_1 se localizan en las células efectoras postsinápticas, principalmente en células del músculo liso vascular, uréter, útero, esfínteres vesicales, tracto gastrointestinal y glándulas salivales y sudoríparas. Su acción en el músculo liso es principalmente de contracción, excepto a nivel gastrointestinal donde paradójicamente producen relajación. La activación de los receptores α_1 a nivel ocular ocasiona también midriasis. Los receptores α_2 se localizan en el sistema nervioso central, en las terminaciones nerviosas adrenérgicas presinápticas, en las plaquetas y en las células β del páncreas. Su estimulación provoca la inhibición de la liberación de noradrenalina y la disminución del tono simpático, con aumento del parasimpático. Como consecuencia de ello, se produce bradicardia, vasodilatación, hipotensión y efecto inotrópico negativo (Abel & Jain, 2012).

Durante muchos años, se pensó que sólo era relevante la capa media de la pared vascular, y también se pensó que eran los receptores localizados en el músculo liso vascular los que controlaban prioritariamente el tono arterial. Sin embargo, las investigaciones de Furchgott, en 1980, cambiaron muchas de las ideas sobre la funcionalidad vascular vigentes hasta entonces. Furchgott y Zawadki demostraron que la relajación vascular inducida por acetilcolina era dependiente de la presencia de endotelio (Furchgott & Zawadki, 1980). Esta relajación se debía a un factor relajante derivado de endotelio, que se identificó posteriormente como óxido nítrico (NO) (Furchgott, 1999). El NO se sintetiza a partir de la L-arginina, por acción de una enzima conocida como la óxido nítrico sintasa (NOS). Esta enzima está presente en las células endoteliales, las plaquetas, los macrófagos, las células del músculo liso y las neuronas (Palmer & Moncada, 1989; Moncada et al., 1991). Se han descrito tres isoformas de la NOS (I, II y

III), también denominadas respectivamente NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS). Las dos primeras son enzimas constitutivas, pero la iNOS se activa por la acción de lipopolisácaridos o por citoquinas, induciéndose su síntesis como un mecanismo de respuesta citotóxica. Las tres isoformas se inhiben de manera competitiva por análogos de la L-arginina, como la N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) (Moncada et al., 1991). Moncada y Vane, en 1984, habían observado además que el endotelio era capaz de liberar prostaciclina (PGI₂), que fue en realidad el primer factor relajante vascular derivado del endotelio que se caracterizó (Moncada & Vane, 1984). Todos estos hallazgos permitieron establecer que el endotelio no era una simple barrera física entre la sangre y la musculatura lisa vascular. Se llegó a la conclusión de que el tono vascular estaba regulado por una serie de factores, liberados en su mayoría por el endotelio. Entre ellos, factores endoteliales vasodilatadores, tales como PGI₂, NO y un factor denominado factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), de naturaleza desconocida, y factores endoteliales vasoconstrictores, tales como el anión superóxido (O₂⁻), endoperóxidos, tromboxano A₂ (TXA₂) y endotelina.

El endotelio como tejido activo está involucrado en una serie de funciones fisiológicas, pero puede perder su funcionalidad como consecuencia de estados patológicos diversos, tales como la hipertensión, la hipercolesterolemia y la diabetes mellitus. La disfunción endotelial se define en realidad como la pérdida de la capacidad vasodilatadora del endotelio, principalmente como consecuencia de una disminución en la biodisponibilidad de NO (Pepine, 1998; Granger & Alexander, 2000).

1.2.2. Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina está directamente implicado en el control de la presión arterial y el equilibrio electrolítico, a través de diferentes mecanismos que dependen de la producción de angiotensina II y

aldosterona (Wolf et al., 2003). La actividad de este sistema es fundamental para la regulación del tono arterial.

La renina, una glucoproteína de 350 aminoácidos, es secretada por las células granulares del aparato yuxtaglomerular, localizado en el túbulo contorneado distal de las nefronas renales. La renina cataliza la conversión del angiotensinógeno (proteína secretada en el hígado, y único sustrato para la renina) en angiotensina I que, por acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), se convierte en angiotensina II, un octapéptido con capacidad vasoconstrictora. Esta angiotensina II es el principal estímulo para la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal, y la aldosterona ocasiona una reabsorción de agua y sodio en los túbulos renales. Ello ocasiona una elevación del volumen intravascular, de manera que se produce un aumento de la presión arterial. Como consecuencia de ello, se pone en funcionamiento un sistema de retroalimentación negativa que provoca una disminución en la liberación de la renina. Cuando el sistema de retroalimentación negativa deja de funcionar, se produce hipertensión arterial, ya que se produce excesiva producción de angiotensina II que favorece la vasoconstricción, la secreción de aldosterona y la retención de agua y sodio.

La inhibición de la ECA impide la transformación de la angiotensina I en angiotensina II, bloqueando así la cascada de reacciones propia del sistema renina-angiotensina. El Captopril, un octapéptido inhibidor específico de la ECA, encabeza un grupo de fármacos, conocidos como inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), que son prioritarios en el momento actual para el tratamiento de la hipertensión. Esta inhibición tiene como consecuencia la supresión en la formación de compuestos vasoconstrictores, tales como la angiotensina II, y también la inhibición de la degradación de sustancias vasodilatadoras, entre ellas la bradiquinina. Sin embargo, cuando se inhibe la ECA, no se bloquea totalmente la producción de angiotensina II. Esto se debe en parte a que la transformación de la angiotensina I en angiotensina II también se produce por acción de determinadas enzimas denominadas quimasas (Husain, 1993). De hecho,

según Katugampola y Davenport (2002), en el corazón humano, la quimasa es la enzima predominante entre las que median la conversión de angiotensina I a angiotensina II. A continuación se muestra un esquema del sistema renina-angiotensina (Figura 2).

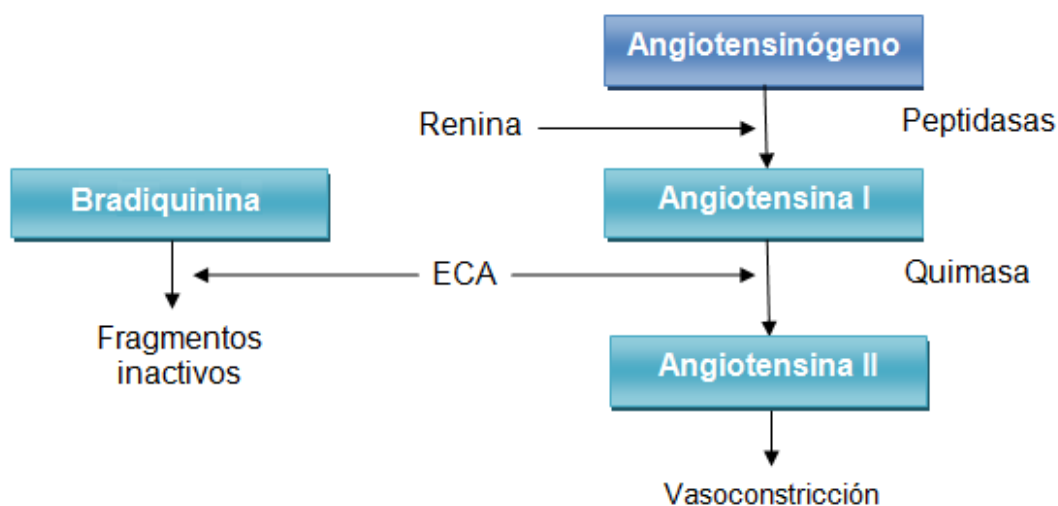


Figura 2. Sistema renina-angiotensina. ECA: Enzima convertidora de angiotensina.

1.2.3. Balance redox y presión arterial

Son numerosas las aportaciones científicas que demuestran que existe una clara relación entre aparición de hipertensión arterial y estrés oxidativo (Touyz & Schiffrin, 2008; Schulz et al., 2008; Harrison & Gongora, 2009; Montezano & Touy, 2012; Meera & Marcus, 2012).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son especies químicas que poseen electrones no apareados en su orbital más externo. Esto justifica su alto nivel de reactividad con otras biomoléculas (Reilly et al., 1991). En situaciones normales, se produce una determinada cantidad de ROS, que tienen un papel fisiológico, pero, en ciertas situaciones patológicas, puede producirse un incremento de estas moléculas. Llamamos estrés oxidativo a

un estado en el cual se produce un desequilibrio entre las ROS que se generan, y las que se degradan, y se produce un incremento final de las mismas.

Las ROS se generan principalmente en la mitocondria, como consecuencia del metabolismo celular. Es importante señalar que algunos defectos en la estructura y en la función de la mitocondria, que suceden fundamentalmente por anomalías genéticas, se asocian a enfermedades cardiovasculares (Marín-García & Goldenthal, 2002). Las ROS también se pueden producir de forma más específica por los fagocitos y otros tipos celulares, como respuesta a distintos agentes externos (agentes ambientales, la luz ultravioleta, agentes farmacológicos, agentes nutricionales, etc). Existen además otras fuentes endógenas de radicales libres, y estos radicales pueden ser consecuencia de la activación catalítica de diversas enzimas metabólicas en los distintos compartimentos celulares.

A concentraciones fisiológicas, las ROS llevan a cabo importantes funciones biológicas (Turpaev, 2002; Hancock et al., 2001; Valko et al., 2007). Estas moléculas desempeñan funciones defensivas (Donkó et al., 2005), y también actúan como agentes vasodilatadores en la circulación cerebral (Miller et al., 2006; Terashvili et al., 2006). Regulan además diversas actividades enzimáticas (Nose, 2000; Galaris & Pantopoulos, 2008) e intervienen en la diferenciación celular, así como en procesos de apoptosis (Suzuki et al., 1997; Ozben, 2007; Chen et al., 2009).

Cuando en un organismo se origina un desequilibrio entre la producción de ROS, y la capacidad del sistema biológico para detoxificar estos productos reactivos, se produce el estrés oxidativo, que causa daño celular y que está involucrado en el desarrollo de múltiples enfermedades. La acumulación de ROS en el organismo provoca daños, tanto estructurales como funcionales a nivel celular, en ocasiones irreversibles. En condiciones patológicas, el aumento de la actividad de las ROS produce una disfunción endotelial, aumento de la contractilidad del músculo liso vascular, crecimiento de este tejido, invasión de monocitos, peroxidación lipídica, inflamación y aumento de los depósitos proteicos de la matriz extracelular.

Además, ocasiona la degradación de los lípidos, las proteínas y el ácido desoxiribonucleico (ADN) (Finkel, 2003; Liu et al., 2005; Dröge & Schipper, 2007). Todos estos hechos son muy importantes para explicar el daño vascular de la hipertensión (Diep et al., 2002; Taniyama & Griending, 2003). La producción de ROS también puede aumentar en otros órganos involucrados en el control de la presión arterial, tales como el corazón, el sistema nervioso y los riñones (Wilcox, 2003; Touyz & Siffirin, 2004; Kishi et al., 2004; Münzel et al., 2008).

Los ROS se generan mediante sucesivas reacciones de reducción que aparecen esquemáticamente en la Figura 3. Comentaremos a continuación las principales reacciones de esta figura.

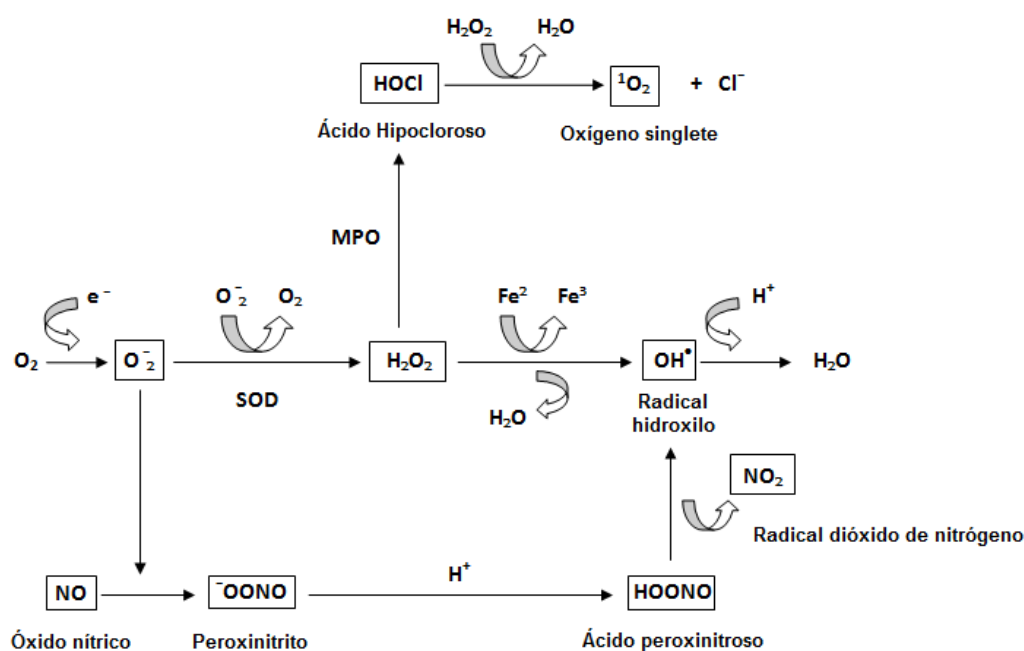


Figura 3. Producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno por reducción del oxígeno molecular. Cl^- = ión cloro; Fe^{2+} = ión ferroso; Fe^{3+} = ión férrico; H^+ = ión hidrógeno; $HOCl$ = ácido hipocloroso; H_2O = agua; H_2O_2 = peróxido de hidrógeno; $HOONO$ = ácido peroxinitroso; MPO = mieloperoxidasa; NO = óxido nítrico; NO_2 = dióxido de nitrógeno; O_2 = oxígeno; $O_2^{\cdot -}$ = anión superóxido; 1O_2 = oxígeno singlete; OH^{\cdot} = radical hidroxilo; $^{\cdot}OONO$ = peroxinitrito; SOD = superóxido dismutasa.

El $O_2^{\cdot -}$ se forma al reducirse el oxígeno molecular mediante la acepción de un electrón, que puede provenir del transporte de electrones de

la mitocondria o retículo endoplásmico, o de la acción enzimática de diversas enzimas como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa o la xantina oxidasa. El NO proviene de la acción enzimática de la sintasa de óxido nítrico (NOS). El O_2^- tiene un alto poder reductor, y por ello puede reaccionar fácilmente con el NO produciendo peroxinitrito ($^{\cdot}OONO$) (Beckman et al., 1990), que genera a su vez ácido peroxinitroso ($HOONO$). Este último puede a su vez descomponerse en radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y dióxido de nitrógeno (NO_2). Por otro lado, el O_2^- debido a su inestabilidad, se dismuta espontáneamente, y mediante la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un agente oxidante muy activo y específico. Tanto el O_2^- como el H_2O_2 pueden dar lugar al radical OH^{\cdot} , que posee efectos nocivos sobre el ADN, y que puede ocasionar graves alteraciones orgánicas. No existe ningún sistema detoxificador enzimático que elimine el radical OH^{\cdot} . Por tanto, es importante que el O_2^- y el H_2O_2 se eliminen rápidamente de la célula, para así evitar la formación de OH^{\cdot} .

Existen sistemas de defensa antioxidante encargados de proteger al organismo de los efectos de los radicales libres. Los sistemas antioxidantes celulares se han agrupado en tres categorías: sistemas antioxidantes primarios, sistemas antioxidantes secundarios y sistemas antioxidantes terciarios. Los sistemas antioxidantes primarios son los que previenen la formación de los radicales libres. Están constituidos por diversas enzimas que participan en procesos antioxidantes. Entre ellas podemos destacar la SOD, la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR). La SOD cataliza la dismutación de O_2^- en O_2 y H_2O_2 (Tulunoglu et al., 1998); la CAT cataliza la descomposición del H_2O_2 en O_2 y H_2O , previniendo la generación de radicales OH^{\cdot} (Sohal et al., 1990); la GPx elimina hidroperóxidos orgánicos y también hidroperóxidos inorgánicos, como el H_2O_2 ; finalmente, la GR también es importante para la eliminación de H_2O_2 por la vía de las GPx, así como para la reconstitución no enzimática del glutatión oxidado (Saicic et al., 1998). Los sistemas antioxidantes secundarios, actúan como moléculas suicidas, oxidándose ellos al

neutralizar los radicales libres. La gran mayoría son antioxidantes exógenos, requiriéndose una continua aportación de estos sistemas o compuestos a través de la dieta. Entre ellos, podemos encontrarnos la vitamina C, o ácido ascórbico (Halliwell & Gutteridge, 1990), el ácido úrico (Strazzullo & Puig, 2007), la vitamina E, el α -tocoferol, los flavonoides, los carotenoides, las ubiquinonas, etc.

Los antioxidantes terciarios son los encargados de reparar biomoléculas dañadas por los radicales libres. Hay enzimas reparadoras del ADN, de las proteínas y de los lípidos. A diferencia de los sistemas antioxidantes anteriores, estos últimos se han estudiado poco. Se sabe que en las células se pueden reparar los lípidos oxidados mediante la actuación de fosfolipasas. Así, la fosfolipasa A₂ se une a los peróxidos lipídicos de los fosfolípidos para repararlos (Pacifici & Davies, 1991). Los ácidos nucleicos oxidados se reparan mediante glucosidasas. Existen glucosidasas específicas que reconocen y escinden bases oxidadas en la doble cadena del ADN, y reparan así estos ácidos nucleicos (Bohr & Anson, 1995; Croteau & Bohr, 1997). Existen también enzimas reparadoras de proteínas oxidadas (Stadtman, 1995). En 1969, McCord y Fridovich identificaron la primera enzima antioxidante, la Cu,Zn-SOD. Desde entonces, se han descrito tres isoformas de esta enzima: la Cu,Zn-SOD o SOD citosólica, la Mn-SOD o SOD mitocondrial y la Cu,Zn-SOD extracelular o ec-SOD. De las tres SOD, la SOD extracelular es la principal a nivel vascular. Las tres isoformas de SOD son productos de distintos genes aunque las tres catalizan la misma reacción, la dismutación de los radicales superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, que puede destruirse a su vez por las enzimas catalasa o GPx. La catalasa es una enzima antioxidante intracelular que está principalmente localizada en los peroxisomas, y algunas veces en el citosol. Cataliza la transformación del H₂O₂ a H₂O y O₂ por lo que protege a las células del H₂O₂ que se genera en su interior.

Aunque tradicionalmente se ha asumido que los macrófagos juegan un papel fundamental en la generación de ROS en la pared vascular (Cathcart & Folcik, 2000), todas las células de la pared vascular (endotelio,

músculo liso vascular y células de la adventicia) producen ROS en cantidades variables en respuesta a diversos estímulos (Griendling et al., 2000).

Sabemos que el NO juega un papel fundamental en la regulación del tono de la pared vascular, y en pacientes con hipertensión esencial se ha detectado una disminución de la cantidad plasmática de este mediador (Node et al., 1997). La deficiencia en la vasodilatación mediada por el endotelio que existe en la hipertensión, se ha vinculado a una disminución en la biodisponibilidad de NO. Esta disminución, podría ser secundaria a la disminución en su síntesis y, de hecho, en algunos modelos experimentales de hipertensión, se ha señalado que la disminución de NO en plasma está relacionada con una disminución de la actividad de la NOS (Malinski et al., 1993; Cuevas et al., 1996; Chou et al., 1998). Sin embargo, la disminución en la biodisponibilidad del NO puede también deberse al aumento de su degradación, como consecuencia de la interacción del NO con O_2^- para formar $^{\cdot}OONO$ (Landmesser et al., 2003). En realidad, la biodisponibilidad del NO, además de estar regulada por la síntesis de este factor, está asimismo determinada por su destrucción, debido a la cantidad de radicales O_2^- existentes (Kerr et al., 1999; Ülker et al., 2003). En situaciones de hipertensión, en las que se produce estrés oxidativo, la inactivación del NO por las ROS parece que es desde luego un mecanismo importante para mantener el aumento del tono arterial (Dröge, 2002; Zalba et al., 2005). De hecho, se ha demostrado que en algunos pacientes hipertensos existe una mayor producción de ROS (Taddei et al., 2001) y un nivel más bajo de SOD (Kumar & Das, 1993). En algunos modelos de ratas hipertensas, también se ha demostrado que existe una mayor producción de radicales O_2^- (Wu & Ding, 2001), una elevación del sistema NADPH oxidasa (Touyz & Schiffrin, 2004; Fortuño et al., 2004), y una disminución de la GPx (Polizio & Peña, 2005). Las ROS producidas por la pared vascular en situaciones patológicas, afectan también a sistemas productores de otros factores vasodilatadores distintos del NO. Se ha demostrado concretamente que el $^{\cdot}OONO$ desacopla

la NOS y también la PGI₂ sintasa, necesaria para la síntesis de PGI₂ (Münzel et al., 2008).

En la actualidad, hay un interés creciente en la utilización de las ROS como diana terapéutica para el tratamiento de la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares. Se ha sugerido por ello que las terapias antioxidantes pueden ejercer una influencia beneficiosa en estas patologías (Paravicini & Touyz, 2008). De hecho, se ha demostrado que la disfunción endotelial que acompaña a la hipertensión, y también la hipercolesterolemia, mejoran en animales de experimentación tratados con antioxidantes (Keaney & Vita, 1995; Baumgartner-Parzer et al., 2012). Sin embargo, desde el punto de vista clínico, los estudios realizados sobre los efectos beneficiosos del tratamiento antioxidante en la hipertensión son poco concluyentes, probablemente debido a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas, a la utilización de métodos poco sensibles, y al uso de terapias antioxidantes incorrectas (Jialal et al., 2002; Hasnain & Mooradian, 2004; Paravicini & Touyz, 2008).

1.3. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

El tratamiento actual para la hipertensión incluye fármacos *clásicos* o *tradicionales*, como son los diuréticos y los β -bloqueantes, y también fármacos *más recientes* o *modernos*, como son los antagonistas del calcio, los IECA y los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA II). Haremos algunos comentarios en este apartado sobre estos grupos farmacológicos, pero hay que tener en cuenta que, para el tratamiento de la hipertensión arterial, se utilizan también α -bloqueantes, fármacos de acción central y vasodilatadores arteriales directos (Kaplan, 1998; Marin et al., 2005).

Comentaremos también en este apartado el papel de las terapias antioxidantes en la hipertensión, pues hay que tener en cuenta que los efectos beneficiosos de algunos agentes antihipertensivos, como los β -bloqueantes, los IECA, los ARA II o los bloqueantes de los canales del Ca^{2+} , podrían estar mediados en parte por la disminución del estrés oxidativo (Godfraind, 2005; Oliveira et al., 2005; Cifuentes & Pagano, 2006). El bloqueo del receptor AT_1 parece especialmente efectivo para reducir la generación de ROS y los marcadores de estrés oxidativo. Estos efectos se han atribuido a la inhibición directa de la actividad de la NADPH oxidasa y a las propiedades antioxidantes intrínsecas de los distintos fármacos que inhiben este receptor (Paravicini & Touyz, 2008).

Fármacos para el tratamiento actual de la hipertensión

Diuréticos: Son los fármacos antihipertensivos más antiguos y siguen siendo uno de los grupos farmacológicos con mayor utilidad para esta patología. Actúan esencialmente disminuyendo el volumen sanguíneo, lo que disminuye a su vez la tensión sobre las paredes arteriales. Según su sitio primario de acción dentro del túbulo renal, se describen cuatro grupos principales de fármacos diuréticos, que pueden utilizarse en pacientes hipertensos o edematosos, pues los diuréticos pueden actuar a distintos niveles en la nefrona (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los diuréticos que pueden utilizarse en pacientes hipertensos o edematosos según su sitio primario de acción.

TIPO	SITIO DE ACCIÓN	EFICACIA DIURÉTICA
Diuréticos de asa	Inhiben el cotransportador Na^+ - K^+ - 2Cl^- en el segmento grueso del asa de Henle.	Máxima eficacia: Fracción de eliminación de Na^+ que supera el 15%.
Diuréticos tiazídicos	Inhiben el cotransportador Na^+ - Cl^- en la porción terminal del segmento diluyente cortical y primer segmento del túbulo contorneado distal.	Eficacia moderada: Con una fracción de eliminación de Na^+ entre el 5 y 10%.
Ahorrradores de K^+	Inhiben los canales de Na^+ en el último segmento del túbulo contorneado distal y primero del túbulo colector.	Eficacia escasa: Fracción de eliminación de Na^+ inferior al 5%. Reducen la eliminación de K^+ .
Inhibidores de la anhidrasa carbónica	Actúan preferentemente en el túbulo contorneado proximal y, en menor grado, en el túbulo colector.	Su eficacia diurética es escasa y facilitan la eliminación de bicarbonato (HCO_3^-).

En diversos ensayos clínicos se ha demostrado la eficacia de los diuréticos en la prevención de las complicaciones cardiovasculares del paciente hipertenso. El mecanismo de acción más conocido de los diuréticos es el de estimular la excreción de agua y cloruro de sodio (NaCl), disminuyendo la volemia (Cohuet & Struijker-Boudier, 2006). Furosemida, Torasemida e Hidroclorotiazida son ejemplos representativos de fármacos que actúan de este modo.

β -bloqueantes: Se unen a los receptores β -adrenérgicos, bloqueando la unión de los agonistas endógenos (adrenalina y noradrenalina), a concentraciones que no causan efectos adversos, por lo que se consideran fármacos seguros, eficaces y económicos (Farrell et al., 2002). Sin embargo, se ha descrito que su utilización conlleva un aumento del riesgo para el desarrollo de diabetes (Lindholm et al., 2003; Pepine & Cooper-DeHoff, 2004). Atenolol, Propanolol y Timolol pertenecen a este grupo de fármacos.

Antagonistas de canales de calcio: Bloquean las corrientes iónicas del calcio a través de los canales lentos de la membrana celular e impiden la entrada de este ión al citoplasma. A nivel vascular favorecen la relajación del músculo liso, reduciendo la resistencia periférica y la sobrecarga cardiaca (Cohuet & Struijker-Boudier, 2006). Verapamilo, Amlodipino y Nifedipino son ejemplos de este grupo de fármacos.

IECA: Impiden la conversión de angiotensina I en angiotensina II. Esta última, no solo tiene efectos presores, sino que es además uno de los mediadores del remodelado vascular y del estrés oxidativo asociado a la hipertensión (Cohuet & Struijker-Boudier, 2006). A su vez, estos fármacos previenen la degradación de la bradiquinina, un péptido vasodilatador que estimula la liberación de factores relajantes derivados del endotelio. Dentro de este grupo de fármacos se encuentran Captopril, Enalapril y Lisinopril, entre otros.

ARA II: Se unen a los receptores AT_1 , inhibiendo la señalización de la angiotensina II a través de esta vía, es decir, los efectos presores y tróficos, sin modificar las acciones mediadas a través de su receptor AT_2 , es decir, la vasodilatación, reducción de la proliferación y la activación del NO (Cohuet & Struijker-Boudier, 2006). Entre estos fármacos se encuentran Losartan, Irbesartan y Valsartan entre otros.

Hay además que comentar que, para las crisis hipertensivas, se pueden utilizar fármacos como Hidralazina, Nitroprusiato o Diazóxido. El Nitroprusiato es en realidad el fármaco de elección en las crisis hipertensivas (Koch-Weser, 1976; Pettinger, 1980). Estos fármacos no se utilizan para el tratamiento continuado de la hipertensión esencial, pues no se administran de forma crónica por los efectos secundarios que producen.

Hipertensión y terapia antioxidante

Como hemos señalado en el apartado anterior, el estrés oxidativo juega un papel fundamental en el desarrollo de la hipertensión arterial y en la disfunción endotelial que acompaña a esta enfermedad. Se ha demostrado que el consumo de frutas y verduras en la dieta, reduce la presión arterial e incrementa la capacidad antioxidante del plasma de sujetos obesos hipertensos (Appel et al., 1997). Las terapias antioxidantes mejoran además la función renal, y promueven el remodelado cardiovascular, provocando un descenso de la presión arterial en animales hipertensos (Virdis et al., 2004). Existe sin embargo bastante controversia respecto a la utilidad que pueden tener los suplementos dietéticos antioxidantes para el tratamiento de la hipertensión. Se han realizado metanálisis con un elevado número de pacientes, para estudiar el efecto que tienen las vitaminas antioxidantes en la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares. La mayoría de estos estudios no pudieron demostrar los efectos beneficiosos de estos compuestos sobre la presión arterial (Jialal et al., 2002; Hasnain & Mooradian, 2004; Paravicini & Touyz, 2008), y tampoco aportaron resultados concluyentes los ensayos en los que se utilizaban micronutrientes antioxidantes como suplementos dietéticos (Ceriello, 2008). Estos resultados podrían sin embargo justificarse en base a que estos estudios no se habían diseñado para investigar específicamente la acción de los antioxidantes sobre la presión arterial y, de hecho, cuando se llevaron a cabo ensayos con dietas antioxidantes, que estaban diseñados específicamente para evaluar los efectos beneficiosos de estas dietas a nivel cardiovascular, se pudo comprobar que las mismas tenían efectos más beneficiosos sobre la hipertensión que los suplementos antioxidantes (Ceriello, 2008; Paravicini & Touyz, 2008). Una posible explicación a este hecho es que estas dietas podrían actuar en cadena de forma más eficiente, mientras que la suplementación con una o más vitaminas no completa este efecto antioxidante. Se sabe además que si un antioxidante no se recupera después de captar un radical libre, en el siguiente paso de la cadena

metabólica se convierte en un prooxidante. Por eso, hay que tener precaución cuando se utilizan suplementos con determinados micronutrientes, como por ejemplo las vitaminas C y E, ya que en determinadas circunstancias estos micronutrientes pueden tener efectos prooxidantes (Ceriello, 2008; Paravicini & Touyz, 2008).

1.4. INGREDIENTES BIOACTIVOS Y ALIMENTOS FUNCIONALES

A lo largo de la historia, la humanidad se ha ido concienciando de que los hábitos alimenticios influyen en el desarrollo de ciertas enfermedades. Distintos estudios epidemiológicos han conseguido que se imponga el consumo de dietas más saludables y la población considera hoy día los alimentos desde una nueva perspectiva, ya que numerosos trabajos científicos han avalado a sus componentes como ingredientes de interés para la salud. Además de las propiedades nutricionales, los componentes de los alimentos pueden ejercer distintas actividades biológicas, y pueden producir un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo (Diplock et al., 1998). En los últimos años, estos componentes alimentarios con actividad biológica se están utilizando para desarrollar nuevos alimentos denominados alimentos funcionales. Hay distintos tipos de componentes alimentarios con actividad biológica. Algunos provienen de las plantas y se conocen con el nombre de fitoquímicos. En el apartado 1.5. nos ocuparemos de estos compuestos denominados fitoquímicos, y más concretamente de los terpenos iridoides.

La reglamentación europea sobre alimentos funcionales, exige que se demuestren científicamente las propiedades funcionales alegadas y que se incluyan estudios de intervención en humanos. También recomienda que se establezcan los mecanismos de acción de los componentes activos presentes en estos alimentos (Reglamento (CE) N° 1924/2006). Esta nueva regulación ha cambiado totalmente el panorama actual de los alimentos funcionales, ya que sólo los componentes aprobados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) podrán comercializarse con alegaciones de salud. Por lo tanto, cuando se desarrollen alimentos funcionales, será imprescindible comprobar científicamente sus propiedades, principalmente cuando se trate de nuevos alimentos. Hay que identificar los principios activos, confirmar su seguridad, y establecer las dosis necesarias para que ejerzan su efecto. En la actualidad, el diseño riguroso de un alimento funcional requiere además conocer a nivel molecular los

mecanismos implicados en la actividad biológica de sus componentes, para así dilucidar la base en la que se fundamenta su mecanismo de acción.

La elaboración de un alimento funcional precisa, en primer lugar, la caracterización y aislamiento de los componentes activos presentes en los alimentos. A continuación, se determinará, mediante ensayos *in vitro*, su diana bioquímica. Posteriormente, habrá que realizar estudios *in vivo* con animales de experimentación para validar los estudios *in vitro*, y se hará uso de biomarcadores u otras estrategias, para obtener información concluyente. Más tarde, se procederá a realizar una adecuación tecnológica para poder incluir los componentes activos en nuevos alimentos. En esta fase, se tienen en cuenta las posibles interacciones del componente activo con otros componentes de la matriz alimentaria, así como la dosis necesaria para el efecto, los procesos culinarios de preparación y su forma habitual de consumo. Deben realizarse después estudios de intervención en humanos, que corroboren la eficacia de estos alimentos y, finalmente, si los resultados son favorables, se procede a su comercialización. En los últimos años, los estudios de actividad biológica de los componentes alimentarios que se han realizado, se han basado principalmente en investigaciones *in vitro*, seguidas de experimentos con animales, y se ha llevado a cabo también un importante avance, aunque todavía insuficiente, en el número de ensayos de intervención en humanos (Figura 4).



Figura 4. Etapas necesarias para el desarrollo de alimentos funcionales.

Son muchas las evidencias científicas publicadas sobre las propiedades biológicas de estos componentes bioactivos. Sin embargo, existen todavía algunos interrogantes relacionados con su consumo y sus efectos sobre la salud. Desde luego, es importante identificar los posibles mecanismos de acción a nivel celular y molecular implicados en su actividad biológica (Farzaneh-Far et al., 2010; Scalbert et al., 2005; Butt & Sultan, 2009), así como investigar nuevas actividades biológicas y dianas terapéuticas (Masterton et al., 2010; Ratliff et al., 2010; Li et al., 2010). También es importante el desarrollo de metodologías para la detección de estos componentes en los fluidos biológicos, ya que en algunos casos los componentes alimentarios se perfilan como nuevos biomarcadores (Salm et al., 2010; García-Villalba et al., 2010). Por otro lado, investigar y mejorar la biodisponibilidad de cada uno de los componentes es clave para entender sus efectos sobre la salud humana. En este contexto, las nuevas tecnologías-ómicas pueden proporcionar una aproximación global al análisis de su metabolismo (Young & Mine, 2009). Una de las líneas más innovadoras se centra en la investigación del efecto de los componentes de los alimentos en la expresión génica (Kim et al., 2010; Lattka et al., 2009), sobre todo en los estudios de intervención (Konstantinidou et al., 2010), y también es importante la investigación de los efectos sinérgicos de cada uno de estos componentes con los restantes componentes alimentarios (Medina et al., 2010; Robertfroid et al., 2010) o con fármacos (Scholle et al., 2009). Es por otra parte necesaria la validación de los métodos que se utilizan para evaluar su actividad biológica, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que permitirá realizar comparaciones entre los diferentes estudios (Bialonska et al., 2010; Wagner et al., 2009). Además, se está introduciendo la idea de mezclar determinados componentes de los alimentos para utilizarlos en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o desórdenes multifactoriales (Bakker et al., 2010).

Es importante tener en cuenta que, en algunos casos, es difícil llegar a saber las dosis de estos componentes bioactivos que son necesarias para la población general. Por eso, estos componentes bioactivos se añaden

cada vez a más y más alimentos, y se considera también importante el desarrollo de nuevos procesos para incorporar estos componentes en los alimentos (Bourre, 2005; Adams, 2010). Esto implica la necesidad de llevar a cabo más estudios de intervención en humanos, que confirmen su seguridad, ya que siempre existe el riesgo de que el consumo elevado de estos componentes alimentarios con actividad biológica, pueda producir efectos nocivos (Saravanan et al., 2010; Yorifuji et al., 2010; Cicero et al., 2010).

Como bien sabemos, la hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular, y, además, el número de pacientes hipertensos no es en modo alguno desdeñable. Por eso, son siempre deseables los nuevos abordajes terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad y, en este contexto, existe en la actualidad un interés creciente en el estudio de los posibles efectos antihipertensivos que pudieran presentar algunos componentes alimentarios, ya que estos podrían utilizarse como ingredientes funcionales para incluirlos en alimentos útiles para la prevención y/o control de esta patología. Sabemos que la hipertensión se asocia con un aumento del estrés oxidativo, y hay desde luego que tener en cuenta que muchos ingredientes de alimentos presentan efectos antioxidantes. Existen de hecho hoy día distintos métodos que permiten establecer el balance redox del organismo y determinar la capacidad antioxidante de los alimentos. Estos métodos resultan muy útiles en la investigación que se lleva a cabo con ingredientes funcionales en animales. Mencionaremos a continuación algunos que han resultado especialmente útiles para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, hay que señalar que la capacidad antioxidante de una muestra se puede establecer en base a su capacidad para absorber radicales libres de oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity = ORAC). El método que proporciona esta medida, conocido como método ORAC, se basa en realidad en la habilidad que tienen los compuestos antioxidantes para bloquear radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno.

Por otra parte, el malonildialdehído (MDA) es un biomarcador del

estrés oxidativo que se forma cuando los radicales libres atacan los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las lipoproteínas del plasma. Los ácidos grasos peroxidados resultantes sufren un acortamiento de su cadena lateral y liberan MDA. Entre los métodos analíticos desarrollados para determinar MDA, destaca el método del ácido 2-tiobarbitúrico, que es un compuesto capaz de formar un aducto cromógeno estable con el MDA.

Finalmente, se puede establecer también la capacidad antioxidante de un organismo determinando los valores de glutatión reducido (GSH) en el hígado. El GSH es un tripéptido, formado por los aminoácidos glutámico, glicina y cisteína, que funciona como un agente reductor no enzimático, capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno y otros radicales. El GSH puede considerarse el principal antioxidante intracelular y puede exportarse desde el hígado a otros tejidos, siempre que sus niveles hepáticos sean adecuados. La forma oxidada es inactiva y raramente sobrepasa el 10% en el hígado, pues, si lo hace, la vulnerabilidad celular aumenta como consecuencia del estrés oxidativo. El GSH se puede cuantificar por un método fluorimétrico basado en la reacción de esta molécula con monoclorobimane. La reacción está catalizada por la glutatión S-transferasa (Sebastià et al., 2003).

1.5. FITOQUÍMICOS: TERPENOS IRIDOIDES

Se conoce como fitoquímicos a una serie de sustancias con actividad biológica que se encuentran en las plantas. Muchas de estas sustancias ayudan a la planta a sobrevivir y actúan como hormonas o enzimas. Otras, simplemente proporcionan color, olor y/o sabor a la planta. La función básica de los fitoquímicos es en realidad ayudar a la planta a protegerse de los radicales libres, insectos, parásitos y virus, y también ayudarla a protegerse del daño general que pueda sufrir la planta a lo largo de su vida. Asimismo, parece posible que los fitoquímicos puedan producir algunos efectos protectores en el organismo humano y en otras especies.

El término hormesis, del griego *ορμάω*, que significa "estimular", fue acuñado en 1943 por Southam y Ehrlich, después de realizar un estudio en el que se demostró que dosis bajas de un extracto fenólico de cedro rojo aumentaban el metabolismo de los hongos de la madera, mientras que dosis altas ocasionaban una inhibición de este efecto (Manchado et al., 2005). La hormesis puede por ello definirse como el efecto estimulador de una sustancia que a mayor concentración es inhibidora. Los organismos han evolucionado hasta adquirir la capacidad de detectar marcadores de estrés producidos por otras especies de su mismo habitat. Esta hormesis entre especies, se conoce como xenohormesis, y describe un fenómeno por el que un organismo detecta las señales químicas que han producido otras especies frente al entorno, y responde a ellas de forma que generen en él efectos beneficiosos (Lamming et al., 2004; Howitz, 2008; Hooper, 2010). La hipótesis de la xenohormesis ha sido recientemente lanzada como posible mecanismo para explicar, al menos parcialmente, los efectos de las plantas en los animales.

Así pues, cuando las plantas se someten a condiciones ambientales adversas, producen como respuesta compuestos químicos que las ayudan a resistir, o las protegen, y que también pueden actuar de forma favorable sobre otras especies. Esto se traduce en una curva de respuesta en forma de J o de U invertida, que se refleja en la Figura 5. Estos compuestos que se denominan en toxicología fitoalexinas, también se conocen con el nombre de

fitoquímicos xenohorméticos.

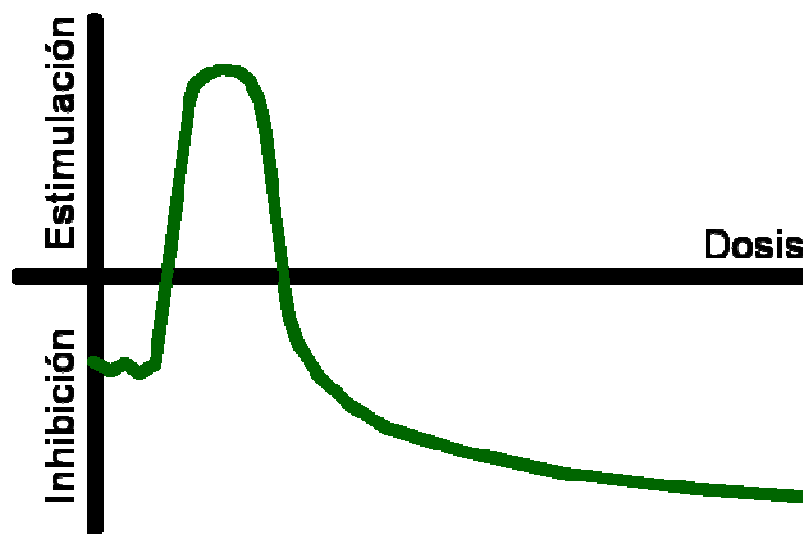


Figura 5. Curva de respuesta en forma de J o de U invertida, que presentan los xenohorméticos, caracterizada por una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas.

Los productos generados por organismos superiores también pueden favorecer a otras especies inferiores. Así, por ejemplo, en 2010, Goldberg et al. descubrieron que el ácido litocólico (LCA), ácido biliar que producen los mamíferos de forma natural durante el proceso digestivo, ralentiza el envejecimiento de levaduras a través de distintos mecanismos: suprimiendo la necrosis inducida por lípidos, atenuando la fragmentación mitocondrial, aumentando la resistencia al estrés oxidativo y térmico, y aumentando la estabilidad del ADN mitocondrial, entre otras cosas. Dado que este microorganismo comparte elementos genéticos comunes con el ser humano, el hallazgo podría tener importantes implicaciones para la salud y la longevidad de nuestra especie (Goldberg et al., 2010). En la Figura 6 se muestra un esquema de esta hormesis entre especies.

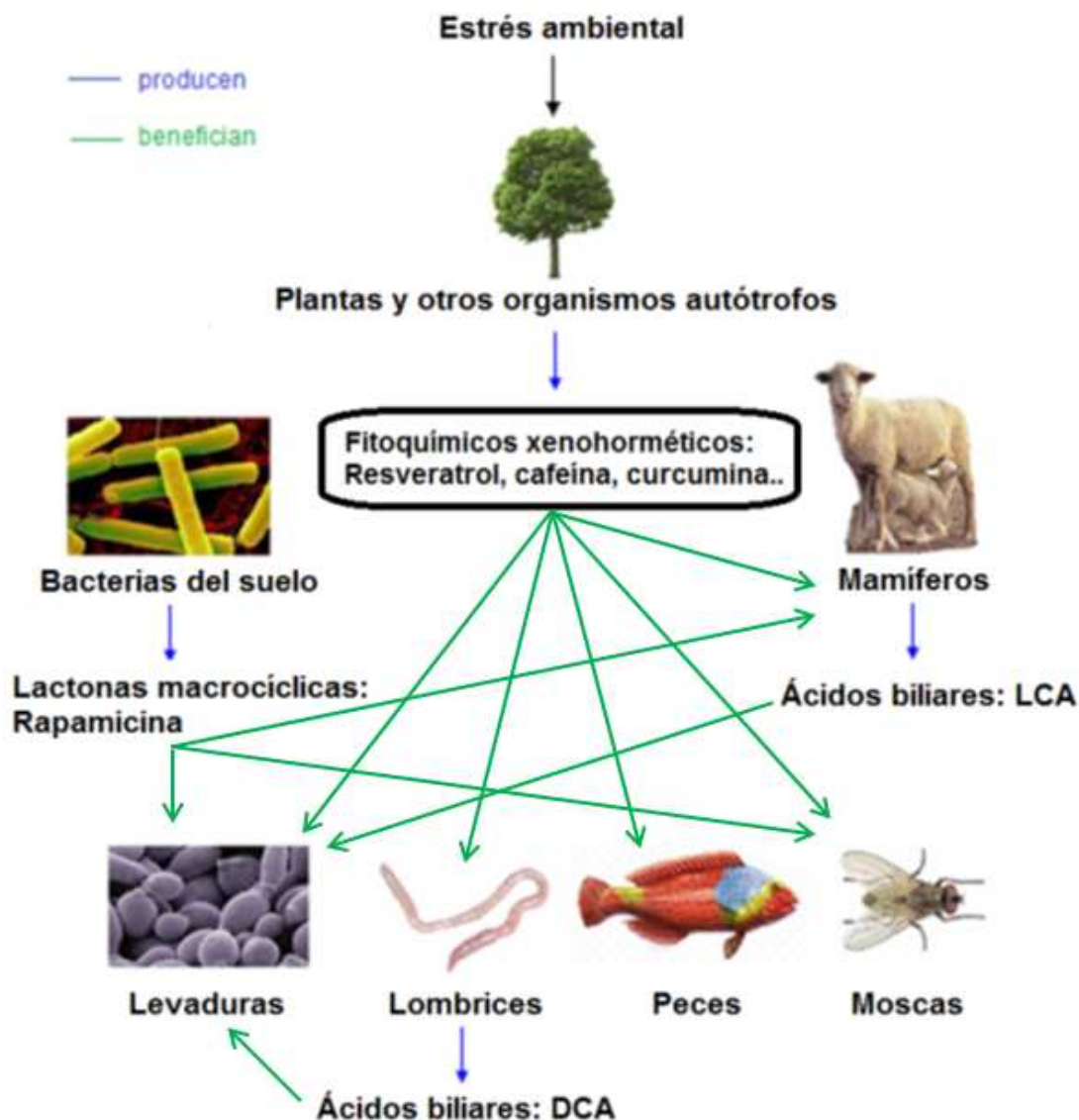


Figura 6. Esquema de la xenohormesis. LCA: ácido litocólico; DCA: ácido dicloroacético.

Los productos derivados de plantas pueden por lo tanto beneficiar a la especie humana. De hecho, la fitoterapia, entendida como curación a través de las plantas, es una disciplina que se ha utilizado ampliamente desde la antigüedad. En 2008 se comprobó que un tercio de los 20 fármacos más vendidos en el mercado derivaban de plantas (Howitz, 2008). Se sabe además que existen numerosos ejemplos de moléculas vegetales que, a

pesar de interactuar con múltiples enzimas y receptores humanos, son extraordinariamente seguras (Corson & Crews, 2007), y por ello podrían incorporarse a la dieta como ingredientes funcionales.

La clasificación de los fitoquímicos se realiza basándose en su estructura química, así como en la actividad biológica que presentan (Tabla 3). Dentro de los principales compuestos considerados hasta el día de hoy como fitoquímicos, podemos encontrar, entre otros, los terpenos (p.e. carotenoides y saponinas), los polifenoles (p.e. flavonoides), los fitoestrógenos (isoflavonas y lignanos), los compuestos azufrados (p.e. glucosinolatos), los polisacáridos (glucanos) y los fitoesteroles. No se conocen todavía bien las bases moleculares de la mayoría de los fitoquímicos, ni tampoco sus interacciones con otros componentes dietéticos, pero está bastante claro que las estructuras de muchos corresponden a compuestos que han probado su eficacia en distintas enfermedades y su función saludable en el organismo humano. En la Tabla 3 aparecen los principales grupos de fitoquímicos y sus principales propiedades saludables.

Tabla 3. Principales fitoquímicos y sus principales propiedades beneficiosas sobre la salud.

FITOQUÍMICOS		PROPIEDADES	REFERENCIAS
TERPENOS	Iridoides	Amebicida Antiinflamatoria Antimicrobiana	Lanhers et al., 1992 Brett et al., 2012
	Saponinas	Anticancerígena Antiinflamatoria Hipocolesterolemia	Cheng-Yu et al., 2010
	Carotenoides	Antioxidante Prevención de degeneración macular Prevención de enfermedades cardiovasculares	Quesada et al., 2011
FITOSTEROLES	Esteroles	Hipocolesterolemia Prevención de enfermedades cardiovasculares	Hallikainen et al., 2011
POLIFENOLES	Isoflavonas	Hipocolesterolemia Prevención de enfermedades cardiovasculares	Cano et al., 2010
	Lignanos	Anticancerígena Prevención de enfermedades cardiovasculares	Cano et al., 2010 Peterson et al., 2010
	Flavonoides	Anticancerígena Antioxidante Prevención de enfermedades cardiovasculares	Toda, 2011
	Antocianinas	Antioxidante	Lin-Hua et al., 2011
	Catequinas	Antiagregante Antiinflamatoria Antiulcérica Antiviral	Song et al., 2005
	Taninos	Antioxidante	Soares et al., 2012
TIOLES	Compuestos organosulfurados	Anticancerígena	Wolfgang et al., 2007

Con el nombre de terpenos o isoprenoides se conoce a un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímicos más difundido. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y, aunque con estructuras químicas muy distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (Figura 7). Los terpenos se encuentran principalmente en los alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en los cereales.

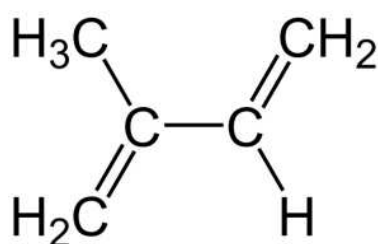


Figura 7. Estructura química del isopreno.

La ruta biosintética de los terpenos se muestra en la Figura 8. Se inicia con la condensación de dos moléculas de Acetil Coenzima A (AcCoA), dando acetoacetil-CoA (AcAcCoA), que a su vez se condensa con otra molécula de AcCoA originando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). El tioéster de la CoA se reduce para formar el aldehído correspondiente, y el mevaldehído (MVA) se reduce nuevamente para convertirse en ácido mevalónico (3,5-dihidroxi-3-metilvaleriánico, MEV). Con la intervención de dos moléculas de adenosin trifosfato (ATP), el mevalonato se fosforila primero, originando sucesivamente mevalonato fosforilado (MEV-P) y mevalonato bifosforilado (MEV-PP), y se descarboxila después para dar como productos los precursores de los terpenos, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), que es un compuesto altamente reactivo. Las enzimas que participan en esta ruta son las siguientes: Acetoacetil-CoA sintetasa (AACoAS), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGCAS), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

reductasa (HMGCoAR), mevalonato quinasa (MEVK), fosfomevalonato quinasa (PMK), mevalonato 5-difosfato descarboxilasa (MDD), difosfato de isopentenilo isomerasa (IPPI).

La condensación, mediante unión “cabeza-cola” de los dos últimos precursores de los terpenos mencionados, el IPP y su isómero DMAPP, origina el geranil-pirofosfato (GPP), que posee 10 átomos de carbono y que es a su vez precursor de un gran número de principios activos vegetales (monoterpenos, iridoides, algunos alcaloides, etc). El acoplamiento al GPP de nuevas unidades de IPP origina moléculas de mayor peso molecular, pudiendo incrementar el número de carbonos en grupos de cinco. Así se forman los sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), triterpenos (C-30), etc. Para la comprensión de esta Tesis Doctoral, hemos creído oportuno centrarnos en el grupo de monoterpenos denominado iridoides.

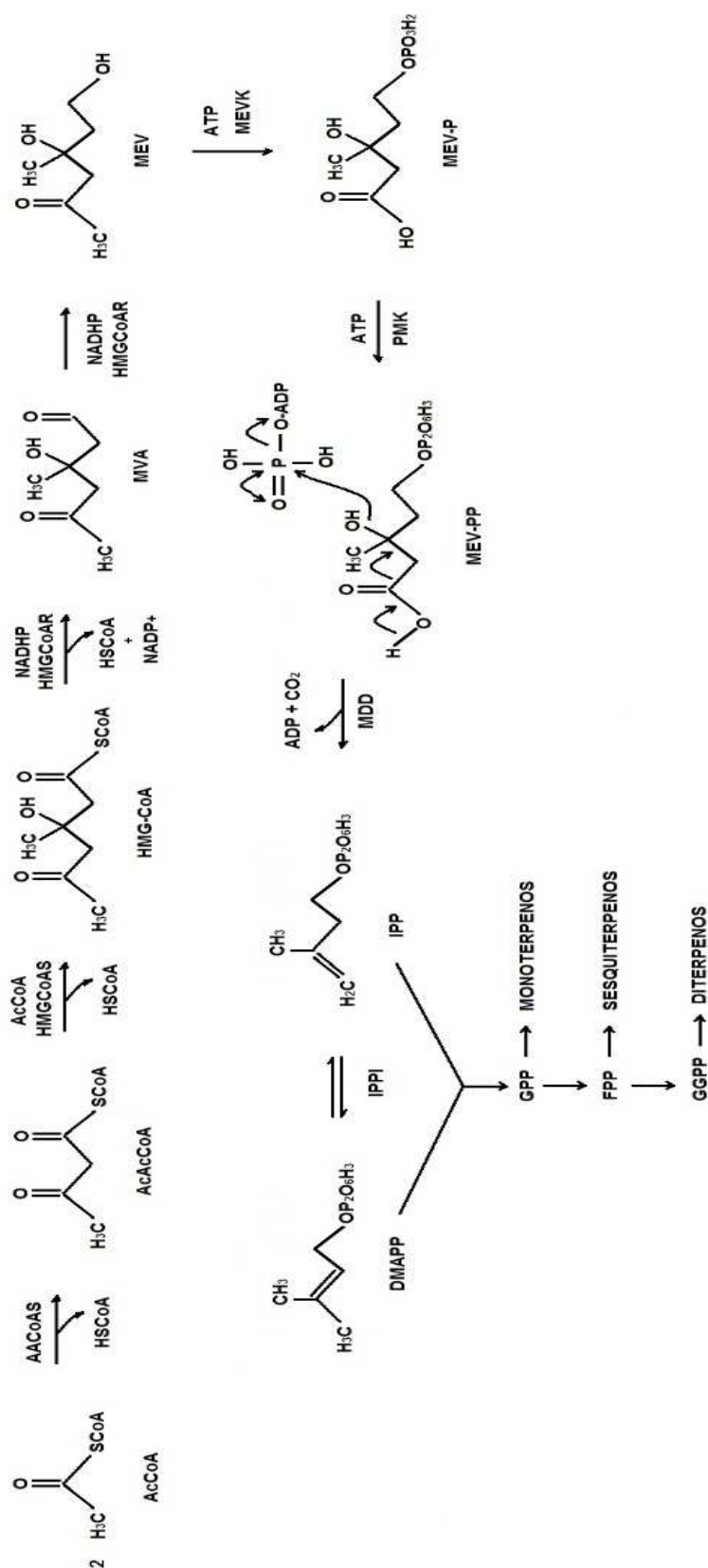


Figura 8. Ruta biosintética de los terpenos. AACoAS = Acetoacetil-CoA sintetasa; AcAcCoA = acetoacetil-CoA; AcCoA = Acetil Coenzima A; ADP = adenosin difosfato; ATP = adenosin trifosfato; DMAPP = pirofosfato de dimetilalilo; FPP = farnesilpirofosfato; GGPP= pirofosfato de geranilgeranilo; GPP = geranil-pirofosfato; HMG-CoA = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; HMGCoAS = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; HMGCoAR = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; HSCoA = coenzima A; IPP = pirofosfato de isopentenilo; IPP1 = difosfato de isopentenilo isomerasa; MEV = ácido mevalónico (3,5-dihidroxi-3-metilvaleriano); MEVK = mevalonato quinasa; MEV-P = mevalonato fosforilado; MEV-PP = mevalonato bifosforilado; MDD = mevalonato 5-difosfato descarboxilasa; MVA = mevaldehído; PMK = fosfomevalonato quinasa; NADHP = nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADP+ = NADHP oxidada.

Bajo el nombre de iridoides, se agrupan una serie de monoterpenos bicíclicos (C₁₀), derivados biosintéticamente del monoterpeno geraniol, que presentan como estructura básica común un esqueleto de átomos de carbono, el 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano, denominado iridano. El núcleo iridano se encuentra frecuentemente fusionado con un heterociclo formado por seis átomos, de los cuales uno es oxígeno, y a este conjunto estructural se le denomina iridoide. Su denominación surge al haberse detectado por primera vez en las hormigas del género *Iridomirmex*. Los iridoides pueden encontrarse como estructuras abiertas, por escisión del enlace entre los carbonos 1 y 5 del esqueleto de iridano (secoiridoides), o cerradas (iridoides propiamente dichos) (Figura 9). Generalmente aparecen en forma de heterósidos, y mayoritariamente como glucósidos.

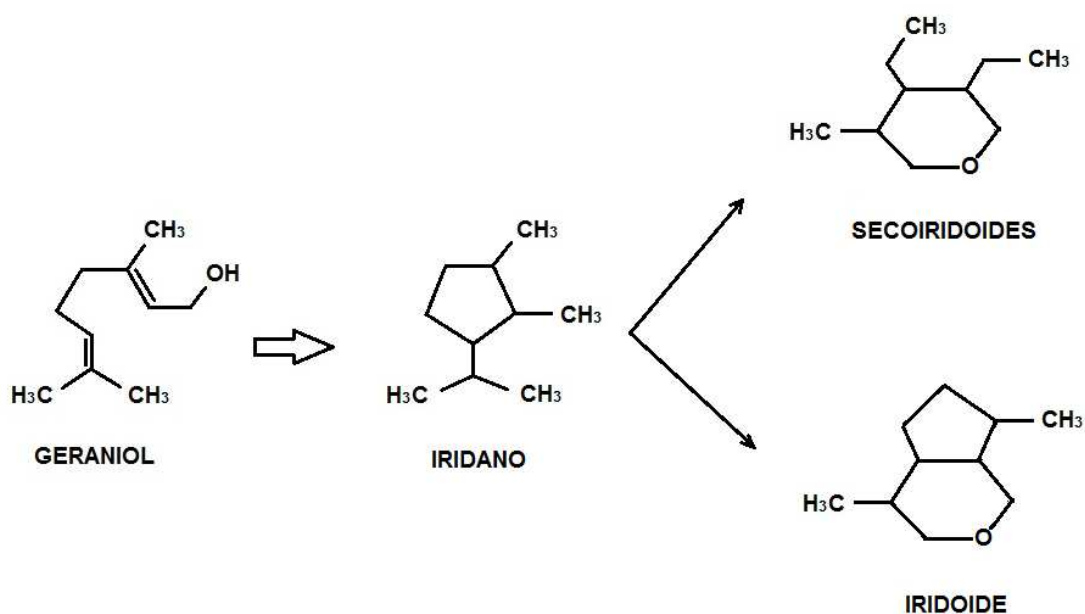


Figura 9. Estructura de los iridoides.

Los iridoides poseen diversas propiedades beneficiosas (Dinda et al., 2011). Estos compuestos pueden mejorar la función hepática (Quan et al., 2009) y pueden estimular la excreción de ácidos biliares (Miyagoshi et al., 1988). Presentan también actividad antimicrobiana (West et al., 2011), antitumoral (Konoshima et al., 2000), antiviral (Bermejo et al., 2002) y

analgésica y antiinflamatoria (Basar et al., 2009), y se utilizan además como antídoto en el envenenamiento producido tras el consumo de hongos venenosos del género *Amanita*. La aucubina, un glucósido iridoide presente en las hojas del arbusto *Aucuba japonica*, protege concretamente frente al daño hepático causado por este mismo género de hongos (Chang et al., 1998).

Los beneficios sobre la salud que pueden producir los flavonoides y polifenoles han suscitado gran interés en los últimos años, pero en ocasiones no se ha tenido en cuenta que muchos de ellos son muy inestables. Estos compuestos se degradan durante el procesamiento, la pasteurización, y el almacenamiento de los productos que los contienen, por lo que estos productos han perdido en la mayoría de los casos algunas de sus propiedades beneficiosas. Por el contrario, los iridoides son muy estables y resistentes a la degradación, permitiéndoles mantener su potencia (Peterson, 2000).

Existen en la naturaleza algunas plantas con propiedades farmacológicas, que resultan útiles precisamente porque contienen principios activos de naturaleza iridoídica. Entre las más importantes, destacan el olivo, el harpagófito, la valeriana, la genciana, el noni y el fresno común, un árbol rico en iridoides que, como las anteriores plantas, se ha utilizado mucho en la medicina popular. A continuación explicaremos brevemente las características y propiedades más importantes de cada una de estas plantas. La Figura 10 muestra las representaciones botánicas de las plantas que vamos a comentar, exceptuando el fresno común que se describirá más adelante. La información sobre el fresno común será en realidad más detallada y tendrá un interés especial, ya que el extracto que se ha utilizado en esta Tesis Doctoral procede de las semillas de este árbol.

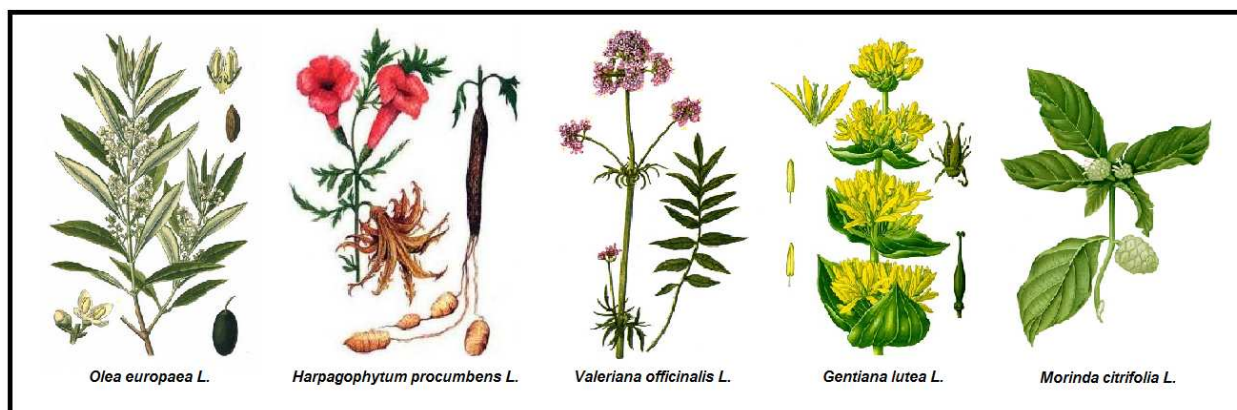


Figura 10. Representaciones botánicas de *Olea europaea* L., *Harpagophytum procumbens* L., *Valeriana Officinalis* L., *Gentiana lutea* L. y *Morinda citrifolia* L.

Olivo

Las hojas de olivo (*Olea europaea* L., familia *Oleaceae*) contienen principalmente iridoides; más concretamente secoiridoides. El secoiridoide mayoritario es el oleuropeósido, también conocido como oleuropeína, que es un compuesto amargo, responsable en gran medida de la actividad antioxidante de las hojas de esta planta. Este glucósido se hidroliza por acción enzimática y, cuando actúa la β -glucosidasa, proporciona 3,4 dihidroxifeniletanol, más conocido como hidroxitirosol, que es un fitoquímico con importantes propiedades antioxidantes (Zhu et al., 2010). La primera referencia científica sobre la aplicación terapéutica de extractos de hojas de olivo data del año 1854 y hace mención a su eficacia en el tratamiento de la fiebre y la malaria (Hanbury, 1854). Hoy en día, se atribuyen también otras bioactividades a las hojas del olivo. Se ha demostrado que los secoiridoides y sus derivados (oleuropeína e hidroxitirosol), presentes en estas hojas y en el aceite de oliva, tienen actividad antimicrobiana *in vitro*, y estos compuestos podrían por ello tener aplicación en el tratamiento de infecciones intestinales y respiratorias en el hombre (Bisignano et al., 1999). Asimismo, en los últimos años, se ha comprobado que las hojas del olivo tienen otras propiedades beneficiosas y presentan actividad antihipertensiva, hipoglucemiante, antiinflamatoria y antioxidante. Estas propiedades se han

demostrado en estudios con animales y también en algunos ensayos clínicos (Somova et al., 2003; Khayyal et al., 2002; Carluccio et al., 2003; Vissers et al., 2004). Algunos extractos de hojas del olivo poseen además propiedades antivirales *in vitro* sobre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y estos extractos parece que pueden ser además útiles en el tratamiento del herpes zóster (Lee-Huang et al., 2003).

Harpagófito

El harpagófito (*Harpagophytum procumbens* L., familia Pedialaceae) es una planta nativa del continente africano, especialmente distribuida en Namibia y en el desierto de Kalahari. Vulgarmente se le conoce como "Garra del diablo", ya que sus frutos son cápsulas leñosas recubiertas de espinas ganchudas y aceradas. Sus tubérculos secos se utilizaron tradicionalmente en la medicina popular por los nativos para el tratamiento de la fiebre, la indigestión, la malaria, las alergias, el cáncer de piel, el reuma y la artritis (Watt & Breyer-Brandwijk, 1962; Stewart & Cole, 2005). Desde su introducción en Europa en el año 1900, los tubérculos secos de esta planta se han utilizado también para recuperar el apetito y aliviar la acidez estomacal. Asimismo, se siguieron utilizando para reducir el dolor y la inflamación en personas con artritis y otros trastornos inflamatorios (Costa De Pasquale et al., 1985; Grahame & Robinson, 1981; Occhiuto et al., 1985; Lanhers et al., 1992; Moussard et al., 1992; Soulimani et al., 1994; Baghdikian et al., 1997). Algunos investigadores han asociado los efectos beneficiosos de esta planta con la presencia en ella de glucósidos iridoides tales como el harpagósido y el pagósido (El-Naggar & Beal, 1980; Kikuchi et al., 1983; Boje et al., 2003; Qi et al., 2006).

Valeriana

La valeriana (*Valeriana officinalis* L., familia Valerianaceae) es una de las plantas más conocidas de uso medicinal. Incluye más de 200 especies y se conoce por sus múltiples efectos farmacológicos, entre los cuales destacan los efectos sedantes, ansiolíticos, antidepresivos y

antiespasmódicos (Leathwood et al., 1982; Hazelhoff et al., 1982; Morazzoni et al., 1995; Hattesoehl et al., 2008). Algunos autores han sugerido además que el valtrato (1 β , 7 β - diisovaleroxi 11 - acetoxi), principal secoiridoide de la valeriana, podría tener actividad antiviral *in vitro* sobre el VIH (Murakami et al., 2002). Muy recientemente, se han aislado e identificado dos nuevos iridoide de las raíces de *Valeriana officinalis* L. (volvaltrato A y volvaltrato B) y tres nuevos sesquiterpenos (E-(-)-3,4-epoxivalerenal, E-(-)-3,4-epoxivalerenil acetato y la mononorvalerenona) (Wang et al., 2009).

Genciana

La genciana (*Gentiana lutea* L., familia *Gentianaceae*) es un arbusto que forma parte de numerosos preparados de hierbas estimulantes gástricas. La raíz de esta planta posee compuestos amargos que estimulan las papilas gustativas. Estos compuestos producen una liberación refleja de saliva y jugos gastrointestinales que aumentan el apetito (Dingermann et al., 2004). El sabor amargo de la raíz, y de la planta en general, se debe a la presencia de glucósidos secoiridoide (swertiamarina, gentiopicrosina, amarogentina y swerosido). Estos secoiridoide le confieren propiedades beneficiosas sobre el sistema digestivo. Entre otros efectos, facilitan las digestiones (efecto eupéptico), estimulan el apetito, aumentan la secreción hepática de bilis y facilitan la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar (efecto colerético y colagogo) (Newall et al., 1996; Öztürk et al., 2006). No sólo los secoiridoide son responsables de los efectos biológicos de la genciana. Existen otros componentes en ella, tales como el ácido longánico, un iridoide con actividad antiinflamatoria (Recio et al., 1994), o las xantonas (gentisina e isogentisina) y los glucósidos de xantonas (gentiósidos), que también muestran bioactividad. Se ha comprobado que las xantonas y los glucósidos de xantonas son potentes inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO) de tipo A y B *in vitro* (Haraguchi et al., 2004). Además, recientemente se ha demostrado que la isogentisina posee efectos protectores contra el daño endotelial causado por el tabaquismo, ya que esta xantona es capaz de disminuir el estrés oxidativo que produce esta enfermedad (Schmieder et

al., 2007).

Noni

El noni, también conocido como gunábana cimarrona, fruta del diablo o mora de la India (*Morinda citrifolia* L., familia *Rubiaceae*), es una planta arbórea o arbustiva originaria del sudeste asiático. Se han identificado en esta planta más de 160 compuestos, entre los cuales destacan los terpenos, las antraquinonas, polisacáridos o alcaloides (Heinicke, 1985). El noni se ha utilizado por los nativos Tahitianos como suplemento alimenticio para el tratamiento de enfermedades y para mantener en general un buen estado de salud. Estudios etnomédicos han atribuido muchas cualidades beneficiosas y un amplio rango de propiedades medicinales al fruto del noni. Se ha descrito que tanto el fruto como las hojas poseen actividad antibacteriana. La raíz de esta planta es además útil para el tratamiento de enfermedades pulmonares como el asma, y también calma el dolor producido por las hemorroides e inhibe la formación de coágulos en la sangre. Se le atribuyen además otras propiedades terapéuticas como: actividad antiinflamatoria, analgésica, antihistamínica, antifúngica, antiviral, anticancerígena y antihipertensiva (Wang, 2001; Mian-Ying et al., 2002; Basar et al., 2010, Gilani, et al., 2010). Estudios recientes han demostrado también que el noni es capaz de reducir el daño hepático agudo inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄), en ratas Sprague-Dawley (Mian-Ying et al., 2008) y en ratas Wistar (Jiménez Martínez et al., 2013).

Actualmente, el zumo de noni se comercializa a través de la empresa estadounidense Tahitian Noni (<http://www.nonivida.cl/>). Los iridoides del noni son extremadamente estables (Peterson, 2000) y el ácido deacetiasperuosido (DAA), iridoide bioactivo más abundante en el zumo comercializado por Tahitian Noni, no se destruye durante la recolección, el procesamiento o el almacenamiento del fruto. Como hemos comentado anteriormente, este tipo de compuestos mantienen sus propiedades saludables a lo largo de toda su vida útil, propiedades que le hacen especialmente atractivo para el desarrollo de alimentos funcionales (Figura

11).



Figura 11. Tahitian Noni™ Original. Bebidas bioactiva comercializada a partir del fruto del noni.

A continuación vamos a explicar más detalladamente las características del fresno común (*Fraxinus excelsior L.*), árbol con un alto contenido en iridoides, del cual procede el extracto utilizado en esta Tesis Doctoral.

Fresno común

El fresno común o fresno europeo (*Fraxinus excelsior L.*, familia *Oleaceae*) es un árbol de hoja caduca distribuido en las zonas templadas de Asia y Europa. También se distribuye en el norte de África, por la zona sudeste de Marruecos. Sus frutos son alargados, tienen una única semilla y se denominan sámaras, porque en ellos se desarrolla un ala aplanada de tejido fibroso y papiráceo a partir de la pared del ovario. En el caso del fresno, la semilla se sitúa en el centro del ala. El fruto de este árbol es en realidad un fruto seco indehiscente, que no se abre por una valva, pero la forma de la sámara favorece la dispersión de los propágulos o semillas por el viento, y este mecanismo de dispersión, en el que el viento favorece el transporte, se denomina anemocoria (Figura 12).



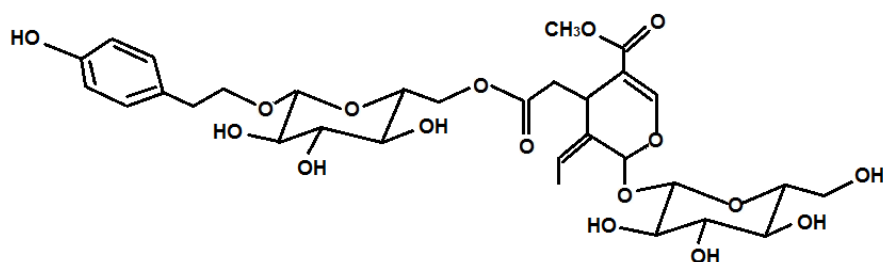
Figura 12. *Fraxinus excelsior* L. - Fresno común o fresno europeo.

Los extractos obtenidos a partir de este árbol, se sabe que tienen propiedades antioxidantes (Meyer et al, 1995; Schempp et al., 2000; Middleton et al., 2005), antiinflamatorias (El-Ghazaly et al., 1992; von Kruegener et al., 1995), antireumáticas (Von Kruegener et al., 1995; Gundermann & Müller, 2007), analgésicas (Okpanyi, 1989) y antipiréticas (Strehl et al., 1995). Las semillas del fresno se han utilizado como condimento culinario y en la medicina popular tradicional (Hedrick, 1919; Parsa 1959; Kunkel, 1984; Boisvert, 2003; Eddouks & Maghrani, 2004). Los extractos acuosos de estas semillas se sabe además que pueden disminuir los niveles plasmáticos de glucosa (Eddouks & Maghrani, 2004; Maghrani et

al., 2004; Eddouks et al., 2005; Visen et al., 2009), y este efecto podría relacionarse con su capacidad para inhibir la reabsorción tubular renal de la glucosa (Eddouks & Maghrani, 2004). Recientemente también se ha sugerido que este efecto hipoglucemiante podría relacionarse con una inhibición de la diferenciación de los adipocitos y una activación de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo α (PPAR- α) (Bai et al. 2010). Se ha señalado también que *Fraxinus excelsior* L. presenta efectos diuréticos, y que sus extractos acuosos disminuyen la PAS de ratas espontáneamente hipertensas y ratas Wistar-Kyoto normotensas (Eddouks et al., 2005).

Durante los últimos años, se ha conseguido aislar una gran variedad de iridoides en las semillas del fresno común. La nuzenida y el GI3, cuyas estructuras aparecen en la Figura 13, son los secoiridoides mayoritarios de un extracto acuoso de semillas de esta planta (Visen et al., 2009). Estos iridoides se volvieron a aislar recientemente en las semillas de esta planta, y además se aislaron otros dos nuevos glucósidos secoiridoides, denominados excelsido A y excelsido B. Aparte de los citados compuestos, se identificaron en estas semillas otros seis compuestos con estructura conocida: GI5, ligustrósido, oleósido 11-metil éster, dimetil éster oleósido, 1'''-O-beta-d-glucosilformósido y salidrósido (Bai et al., 2010).

A)



B)

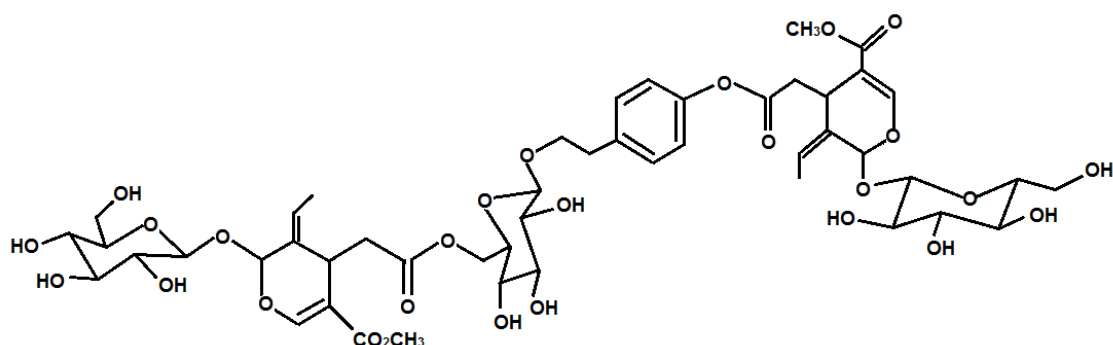


Figura 13. Estructura química de la nuzenida (A) y del GI3 (B).

La nuzenida y el GI3 están presentes también en otras plantas distintas del fresno. Varios estudios han caracterizado la nuzenida en las semillas del fruto del olivo (aceituna). Se han estudiado las distintas partes de este fruto y se ha comprobado que contiene diferentes compuestos fenólicos, tales como flavonoides, y secoiridoides (Macheix et al., 1990). En 1999 Maurizio Servili et al. caracterizaron la nuzenida en las semillas de las aceitunas procedentes de tres cultivos italianos ("Moraiolo", "Leccino" y "Coratina"). La nuzenida era el compuesto fenólico que aparecía más concentrado en los tres cultivos (Servili et al., 1999). Recientemente, se ha publicado un artículo que demuestra la presencia de nuzenida en las semillas de las aceitunas de seis cultivos portugueses: "Bical", "Cobrançosa", "Lentisca", "Madural", "Santulhana" y "Verdeal Transmontana". También en este caso, la nuzenida, junto con el 11-metil

oleósido de nuzenida, eran los principales compuestos fenólicos detectados (Silva et al., 2010).

La nuzenida y el GI3 también se han aislado de otras plantas como el Aligustre (*Ligustrum lucidum* Ait., familia *Oleaceae*), que es un arbusto de hoja perenne procedente de China. La nuzenida y el GI3 son en realidad los principales secoiridoides con estructura glucosídica del fruto del Aligustre, y se ha comprobado que ambos tienen una importante actividad antioxidante, siendo el GI3 el que mayor actividad presenta (Li et al., 2007). Asimismo, extractos de esta planta han mostrado efectos protectores en ratas a las que se les induce estrés oxidativo mediante la administración de butilhidroxitolueno (Lin et al., 2007). Son sin embargo necesarios más estudios de la actividad biológica de nuzenida y GI3 para poder relacionar los efectos biosaludables del fresno con el contenido que esta planta tiene de estos secoiridoides.

1.6. FRAXIPURE™

FraxiPure (FRP) es un extracto rico en compuestos fenólicos obtenido a partir de las semillas del fresno común (*Fraxinus excelsior* L.). Indicamos a continuación el proceso de fabricación de este extracto.

Según se describe en distintos trabajos (Eddouks & Maghrani, 2004; Maghrani et al., 2004; Eddouks et al., 2005), las sámaras o frutos de *Fraxinus excelsior* L. para la fabricación de FRP se cosecharon en los árboles de las montañas de la cordillera del Atlas en Marruecos (ver Figura 14). Una vez recolectadas, las semillas se separaron a mano de forma tradicional. Después, las semillas se analizaron para confirmar su origen botánico. Los análisis incluyeron técnicas macroscópicas, microscópicas, y cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). El extracto FRP se obtuvo a partir de estas semillas de *Fraxinus excelsior* L. mediante un proceso industrial patentado (He et al., 2008), basado en el método tradicional utilizado en Marruecos.



Figura 14. Localización geográfica de la especie vegetal, *Fraxinus excelsior* L., en el continente africano.

El proceso de obtención de FRP consta de una serie de etapas, que se reflejan en la Figura 15. Como puede apreciarse en esta figura, para la obtención de este extracto, las semillas de *Fraxinus excelsior* L. se muelen en primer lugar hasta obtener un polvo homogéneo. A continuación, se lleva

a cabo una extracción en agua con agitación durante 2 horas a 65 °C, y se separa la fracción líquida de la fracción sólida mediante filtración. La solución clarificada se concentra a vacío, a 40 °C, y después de esta etapa de concentración, se mezcla el producto resultante con goma arábica y dióxido de silicio. Seguidamente, se procede a un secado por pulverización, para obtener un polvo fino que se somete a un posterior tamizado. Finalmente, el producto se etiqueta y envasa, pero antes se toman muestras para comprobar su aspecto general, y se llevan a cabo controles de calidad final, controles analíticos y controles microbiológicos. El contenido en humedad del extracto final debe ser menor del 8%, y la relación “Semillas de *Fraxinus excelsior* L.: Polvo de extracto” debe ser aproximadamente 6:1.

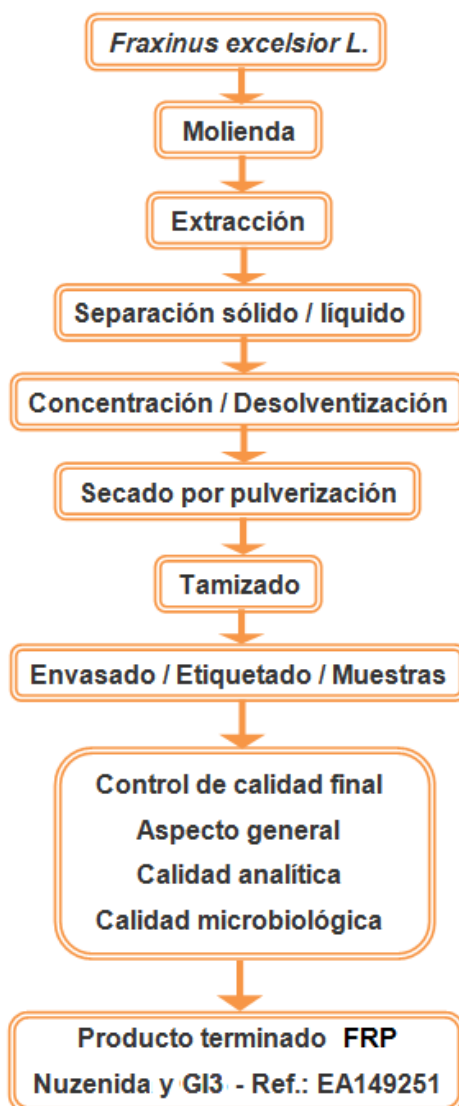


Figura 15. Esquema de la obtención de FraxiPure (FRP).

En 2009, Visen et al. caracterizaron el extracto FRP mediante estudios de HPLC. Estos estudios revelaron la existencia de dos picos mayoritarios con tiempos de retención de aproximadamente 13 y 18 minutos. Estos picos, se identificaron como nuzenida y GI3, respectivamente. Como ya se ha comentado en el apartado anterior, estos dos compuestos son los principales secoiridoides de un extracto acuoso de semillas de *Fraxinus excelsior L.* FRP contiene concretamente un 6,8% de nuzenida y un 5,8% de GI3 (Visen et al., 2009). Bai et al. (2010) volvieron a aislar estos

secoiridoides junto con otros dos nuevos glucósidos secoiridoides, denominados excelsido A y excelsido B, e identificaron sus estructuras mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Aparte de los citados compuestos, se identificaron además otros seis compuestos con estructura conocida: GI5, ligustrósido, oleósido 11-metil éster, dimetil éster oleósido, 1'''-O-beta-d-glucosilformósido y salidrósido (Bai et al., 2010). Todos ellos se han nombrado ya en el apartado anterior (página 60).

Se demostró que FRP presentaba propiedades hipoglucemiantes en voluntarios sanos (Visen et al., 2009), y se comprobó también que este extracto atenuaba el aumento de peso corporal y la hiperglucemia inducida en ratones obesos alimentados con una dieta rica en grasa (Ibarra et al., 2011). Algunos estudios recientes en voluntarios sanos han demostrado además la seguridad y tolerabilidad de FRP para el consumo humano (Flanagan et al., 2013). Según se indicó en el apartado anterior (apartado 1.5.), Eddouks et al., obtuvieron un extracto acuoso de *Fraxinus excelsior* L., en 2005, distinto de FRP, que presentaba efectos diuréticos y antihipertensivos en ratas SHR y WKY (Eddouks et al., 2005). No existe sin embargo ningún estudio hasta este momento para esclarecer los posibles efectos antihipertensivos de FRP en animales o humanos.

1.7. LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN

El empleo de animales de experimentación ha sido muy útil para investigar e identificar los diferentes factores que pueden ser detonantes en la aparición de la hipertensión arterial. Estos modelos animales permiten además estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo y mantenimiento de esta enfermedad, así como conocer cómo se puede prevenir su desarrollo y estudiar sus posibles tratamientos.

Los modelos experimentales de hipertensión arterial deben cumplir una serie de requisitos. Deben ser fáciles de desarrollar, ser relativamente baratos, conseguirse con animales pequeños, y ser adecuados para determinar las propiedades terapéuticas de los diferentes agentes antihipertensivos. Conviene, además, que un determinado agente antihipertensivo se evalúe en distintos modelos, ya que puede actuar por distintos mecanismos (López-Miranda, 1998).

El uso de modelos murinos está ampliamente extendido en todo el mundo, ya que estos modelos, además de permitirnos realizar procedimientos experimentales que no pueden realizarse en pacientes (inyecciones intracraneales, denervación, nefrectomía, etc.), presentan características de comparabilidad y reproductibilidad entre grupos que resultan imposibles de alcanzar en los estudios clínicos humanos. La localización anatómica de las diferentes arterias en la rata convierte a este animal en el más idóneo para la investigación de sustancias antihipertensivas. La arteria de la cola de la rata permite llevar a cabo medidas incruentas de presión arterial y, para ello, se utiliza un pequeño manguito inflable y un transductor de presión semejante a un esfigmomanómetro. La rata presenta, por otra parte, un tamaño muy adecuado que facilita su manejo, y su coste es relativamente bajo. Estos animales tienen además una vida media muy corta, y eso nos permite investigar en un breve período de tiempo lo que en un humano llevaría 40 o 50 años.

Se han desarrollado diferentes modelos experimentales de

hipertensión arterial en ratas, pero el más utilizado es el de las **ratas espontáneamente hipertensas (SHR)**, que se desarrolló mediante la selección y el cruce de ratas de la cepa Wistar, de la Universidad de Kyoto, que presentaban una presión arterial elevada. Partiendo de la sexta generación endogámica, se consiguió con estos animales una nueva raza de ratas hipertensas, que se conocen hoy día como ratas SHR (Okamoto & Aoki, 1963). La cepa de ratas Wistar-Kyoto (WKY), de la que se partió en 1971 para desarrollar este modelo experimental, se consideró el control normotenso de las ratas SHR. Sin embargo, es importante destacar que algunos investigadores, teniendo en cuenta como se desarrolló el modelo de las ratas SHR, consideran que las ratas WKY son animales prehipertensos (Wright & Rankin, 1982). La esperanza de vida de las ratas SHR en condiciones normales de cuidado y mantenimiento es aproximadamente de 18 meses, mientras que las ratas WKY suelen vivir unos 24 meses.

El desarrollo de hipertensión en las ratas SHR presenta claras analogías con el desarrollo de hipertensión arterial esencial en humanos. Aunque la rata SHR y el hombre presentan diferencias en su genoma, y aunque son también diferentes las condiciones ambientales que influyen en la aparición de hipertensión en estas dos especies, distintos investigadores coinciden en señalar que los principios básicos asociados al desarrollo de hipertensión son sorprendentemente muy similares en ambos casos (Okamoto & Aoki, 1963; Trippodo & Frohlich, 1981; Sánchez et al., 1986; Zicha & Kunes, 1999). En ambos, la hipertensión arterial está condicionada genéticamente, existiendo por ello un importante factor de agregación familiar. En las primeras fases de la hipertensión, la rata SHR presenta un incremento del gasto cardíaco, sin cambios en la resistencia periférica, pero, cuando la hipertensión de la rata SHR progresa a una situación de hipertensión establecida, el gasto cardíaco retorna a valores normales y se incrementa la resistencia periférica total (Smith & Hutchins, 1980), de forma similar a lo que sucede en el ser humano (Palatini & Julius, 1997). La hipertensión arterial en las ratas SHR, al igual que en el hombre, se ve además agravada por la ingesta de una dieta rica en sodio, por el estrés y

por otros factores ambientales. No obstante, existen algunas diferencias entre la hipertensión arterial humana y la hipertensión arterial de las ratas SHR. Así, por ejemplo, los pacientes hipertensos suelen tener un exceso de peso corporal en comparación con las personas normotensas, pero las ratas SHR pesan menos que sus controles normotensos. Se ha descrito además que en las ratas SHR existe una alteración en la función tiroidea (Kojima et al., 1975), pero los pacientes hipertensos no presentan necesariamente este tipo de alteración. Desde el punto de vista terapéutico, cabe señalar que las ratas SHR muestran una respuesta poco definida a los diuréticos, y sin embargo, el uso de estos fármacos es altamente efectivo para reducir la presión arterial en los pacientes hipertensos. Otra diferencia importante es que la aparición de arteriosclerosis en personas hipertensas es muy frecuente y, sin embargo, las ratas SHR parecen mostrar cierta resistencia al desarrollo de esta enfermedad (Trippodo & Frohlich, 1981).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

En base a la información reseñada, nuestra hipótesis para este trabajo es la siguiente: "FRP puede tener efecto antihipertensivo en ratas SHR, y también efectos diuréticos y antioxidantes, que justificarían la modificación de la presión arterial producida por este extracto en estos animales".

2.2. OBJETIVOS

Para demostrar la Hipótesis anterior, el objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de FRP sobre la presión arterial, la diuresis y el balance redox de ratas SHR. Este objetivo general se desglosó en distintos objetivos más concretos, encaminados también a definir la posible utilidad de este extracto como ingrediente de un alimento funcional. Estos objetivos se señalan a continuación:

1. Evaluar el efecto de la administración intragástrica aguda de distintas dosis de FRP sobre la presión arterial de ratas SHR.
2. Evaluar el efecto diurético de FRP en ratas SHR.
3. Evaluar el efecto de la administración oral crónica de FRP sobre la presión arterial, el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de ratas SHR.
4. Realizar determinaciones en el plasma y el hígado de las ratas SHR tratadas con FRP, que nos permitan dilucidar si este extracto presenta efecto antioxidante en estos animales.
5. Evaluar la respuesta relajante vascular endotelio dependiente de

acetilcolina en ratas SHR tratadas crónicamente con FRP.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PROTOCOLO GENERAL

En esta Tesis Doctoral, evaluamos en primer lugar el efecto que tenía la administración aguda de un extracto de fresno común (*Fraxinus excelsior* L.), FRP, sobre la presión arterial de ratas SHR. Este extracto se administró también a un grupo de ratas normotensas WKY. Se determinó asimismo la capacidad antioxidante total del plasma de las ratas tratadas de forma aguda con FRP, y se midieron los niveles plasmáticos de MDA en estos animales.

Evaluamos también el posible efecto diurético de FRP en las ratas SHR. Para ello, después de la administración del extracto, recolectamos y medimos el volumen de orina excretado por estos animales, durante 4 horas. Esto nos permitió calcular la excreción volumétrica de orina (EVO) de las ratas. Se obtuvieron además muestras plasmáticas de los animales, y se realizaron determinaciones cuantitativas, tanto plasmáticas como urinarias, de distintos analitos. Finalmente, con los datos de estas determinaciones, calculamos el aclaramiento de creatinina (Acr) de las ratas, y la fracción de excreción (FE) de los distintos analitos, en estos animales.

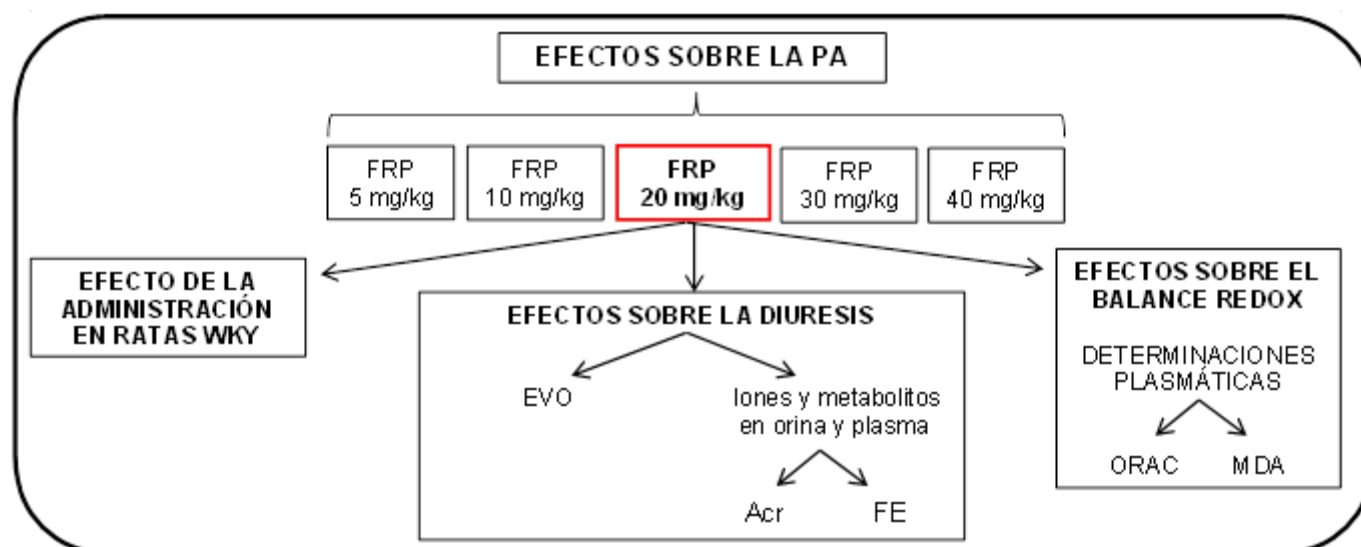
Tras concluir los ensayos anteriormente relatados, se llevó a cabo otro ensayo en el que administrábamos FRP de forma continuada a las ratas SHR, en el líquido de bebida. La administración comenzaba cuando se destetaban las ratas, y duraba hasta que tenían 20 semanas de vida. Transcurrido este período de tiempo, sacrificábamos la mitad de los animales tratados, y retirábamos el tratamiento a las restantes ratas, que permanecían 4 semanas más ingiriendo únicamente agua en el biberón. Una vez transcurridas estas 4 semanas, estos animales también se sacrificaban. Durante el ensayo, se controló semanalmente la presión arterial de las ratas SHR, y también su peso corporal, su ingesta sólida y su ingesta líquida. En los animales sacrificados, se extrajo la aorta, y este tejido se utilizó para realizar ensayos con acetilcolina, en preparaciones de anillos de esta arteria, que se montaban en baños de órganos tradicionales. Se obtuvieron también muestras de plasma y tejido hepático en los animales sacrificados, para

realizar distintas determinaciones que podían reflejar su estado redox. Concretamente, estas muestras se obtuvieron para realizar determinaciones de la capacidad antioxidante del plasma, determinaciones de los niveles plasmáticos y hepáticos de MDA, y determinaciones de los niveles de GSH en el hígado.

Todos los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral cumplen la normativa de experimentación animal (Directiva Europea 86/309/CEE), el Real Decreto 223/1988 del Ministerio Español de Alimentación Agricultura y Pesca, y el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre (BOE nº 252, de 21 de octubre), sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

La Figura 16 muestra un esquema de la experimentación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral con FRP. En ella, no aparecen reflejados los ensayos en los que se administró agua a las ratas (control negativo), ni los ensayos realizados con otros fármacos que se utilizaron como controles positivos del efecto antihipertensivo (Captopril) o diurético (Furosemida y Torasemida).

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE FRAXIPURE EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS



EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE FRAXIPURE EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

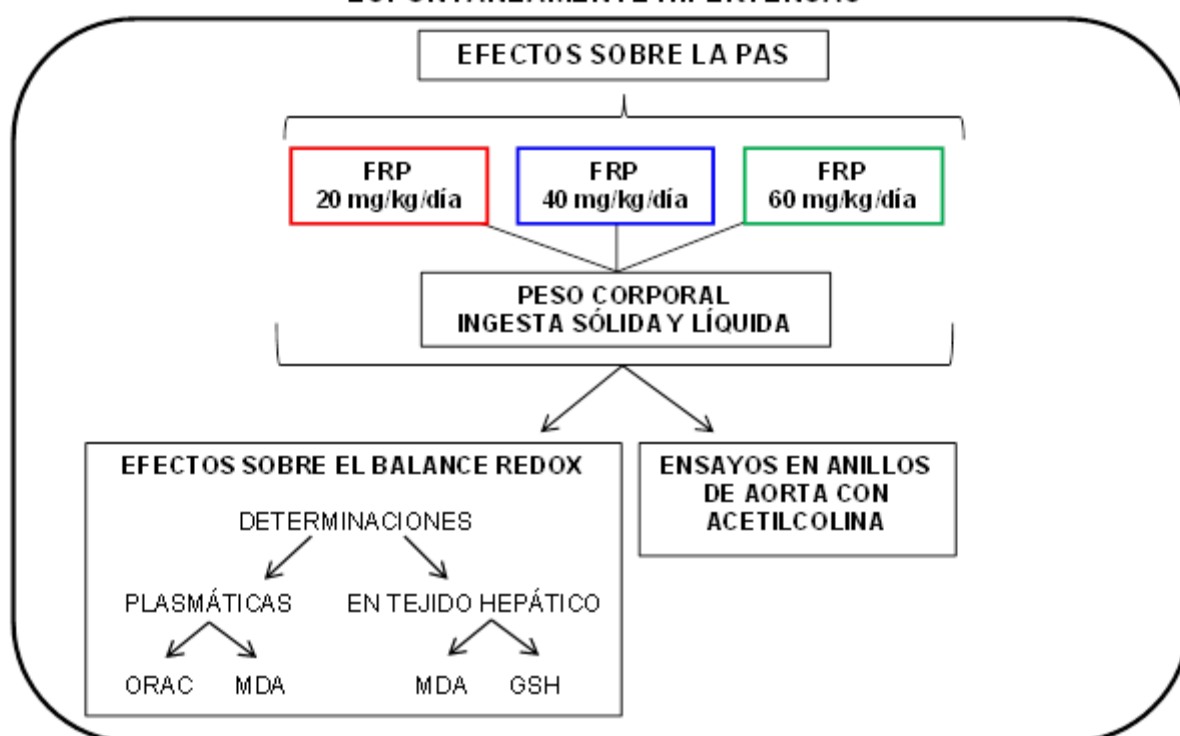


Figura 16. Esquema de la experimentación realizada con FraxiPure (FRP); Acr: Aclaramiento de creatinina; EVO: Excreción volumétrica de orina; GSH = Glutatión reducido; MDA = Malonildialdehído; ORAC = Oxygen Radical Absorbance Capacity = Capacidad para absorber radicales libres de oxígeno; PAS = Presión arterial sistólica; SHR = Ratas espontáneamente hipertensas; WKY = Ratas Wistar-Kyoto.

3.2. ESTUDIOS PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE FRAXIPURE EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

3.2.1. Efectos sobre la presión arterial

Para el estudio, se utilizaron 30 ratas macho SHR, de 17-22 semanas de vida y peso comprendido entre 300 y 350 g. También se utilizaron 8 ratas WKY, de 17-22 semanas de vida y peso comprendido entre 320 y 400 g. Todas estas ratas procedían de Charles River Laboratories S.A. (Barcelona, España). Los animales se almacenaron de cinco en cinco en jaulas, y se mantuvieron ingiriendo agua y dieta estándar para ratas a libre disposición (A04 Panlab, Barcelona, España), a una temperatura estable de 23 °C y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

Se ensayaron las siguientes dosis de FRP en las ratas SHR: 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg y 40 mg/kg. Las dosis se administraban siempre por vía intragástrica y disueltas en 1 ml de agua. Como control positivo, se utilizó un grupo de ratas SHR a las que administrábamos, por el mismo procedimiento, 50 mg/kg de Captopril (Sigma-Aldrich S.A, Madrid, España), y como control negativo, se utilizó otro grupo de ratas SHR a las que administrábamos, también mediante sonda intragástrica, 1 ml de agua. Los ensayos en estos últimos animales permitían conocer además la variación circadiana de la presión arterial en las ratas.

Las administraciones mencionadas se llevaron a cabo en un margen de tiempo comprendido entre las 9 y las 10 horas de la mañana. Antes de la administración correspondiente, medíamos la PAS y la PAD de la rata, mediante el método del manguito en la cola, descrito en el apartado 3.4.1. Estas variables se medían nuevamente en el animal después de la administración, cada dos horas, hasta ocho horas post-administración. Medíamos además la PAS y la PAD de las ratas cuando habían transcurrido 24 y 48 horas de la administración.

En los ensayos de las ratas normotensas WKY, sólo administramos la dosis de 20 mg/kg de FRP a los animales. También se utilizó como control

negativo un grupo de ratas de esta raza a las que administramos 1 ml de agua. Los ensayos fueron por lo demás idénticos a los descritos para las ratas hipertensas.

Antes de llevar a cabo los ensayos anteriormente descritos, todas las ratas se acostumbraban al procedimiento de medida de la presión arterial durante una semana como mínimo. Además, después de administrar una dosis determinada de un producto, a una rata, esperábamos siempre como mínimo 4 días, para realizar una nueva administración en ese animal. Para evitar posibles errores en la estimación de la presión arterial, y garantizar un mayor rigor científico en los ensayos descritos, se utilizó el método de doble ciego, de forma que el investigador sólo supo cuál era el producto y la dosis administrada después de haber medido la PAS y la PAD en las ratas.

Las Figuras 17 y 18 son dos esquemas de los ensayos descritos, que muestran, respectivamente, los de las ratas SHR y los de las ratas WKY.

Hay que señalar que, como consecuencia de los ensayos realizados para evaluar el posible efecto diurético de FRP en las ratas SHR, descritos en el siguiente apartado (3.2.2.), también se llevaron a cabo medidas de la PAS en ratas SHR antes de la administración intragástrica de 1 mg/kg de Torasemida, y antes de la administración intragástrica de 10 mg/kg de Furosemida. Asimismo se volvió a medir la PAS 4 horas después de estas administraciones. Hay que tener en cuenta que en los estudios descritos en el apartado 3.2.2., 1 mg/kg de Torasemida y 10 mg/kg de Furosemida se utilizaron como controles positivos del efecto diurético. Los efectos de estas administraciones sobre la PAS de las ratas SHR se reflejan en la Figura 19.

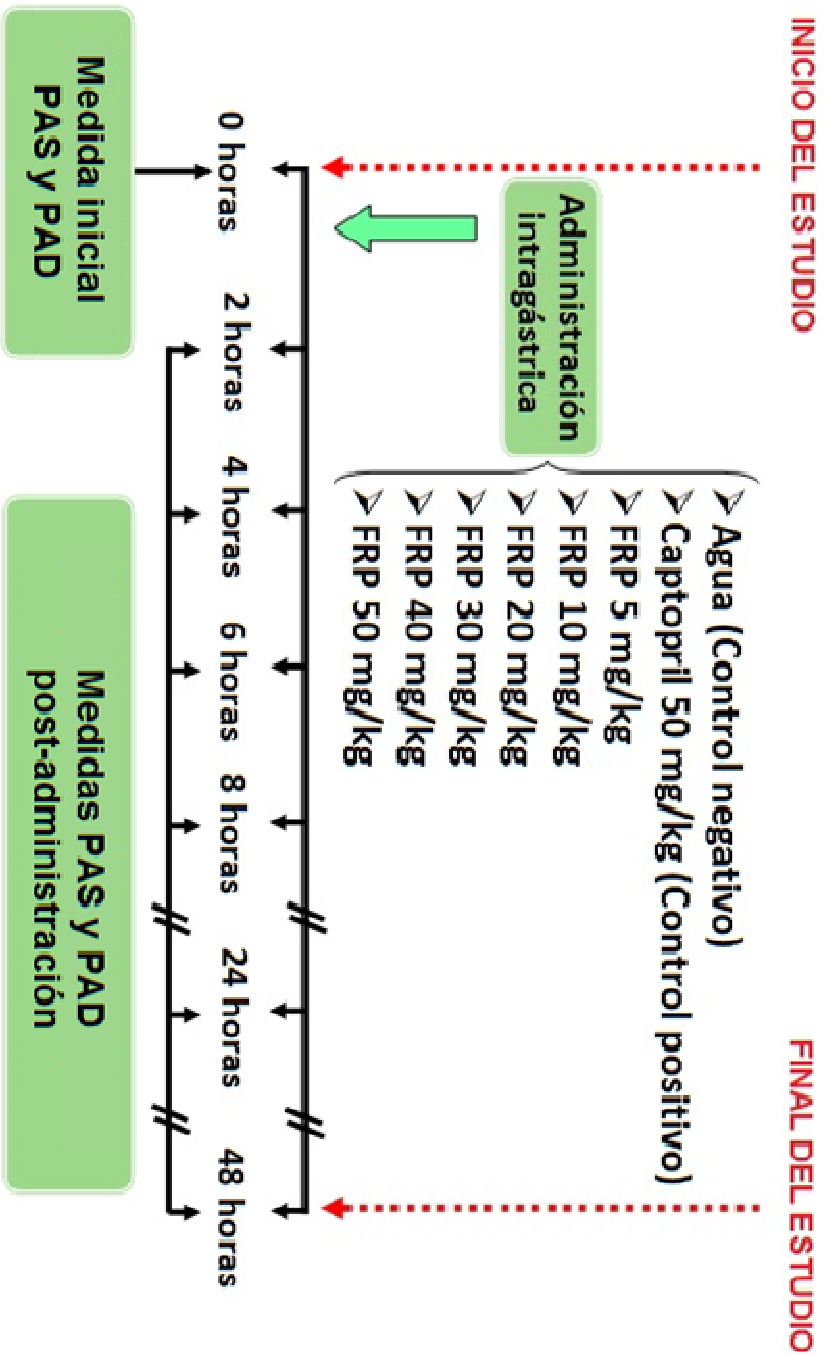


Figura 17. Protocolo experimental para evaluar el efecto sobre la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), de ratas espontáneamente hipertensas, de la administración intragástrica de 1 ml de agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP).

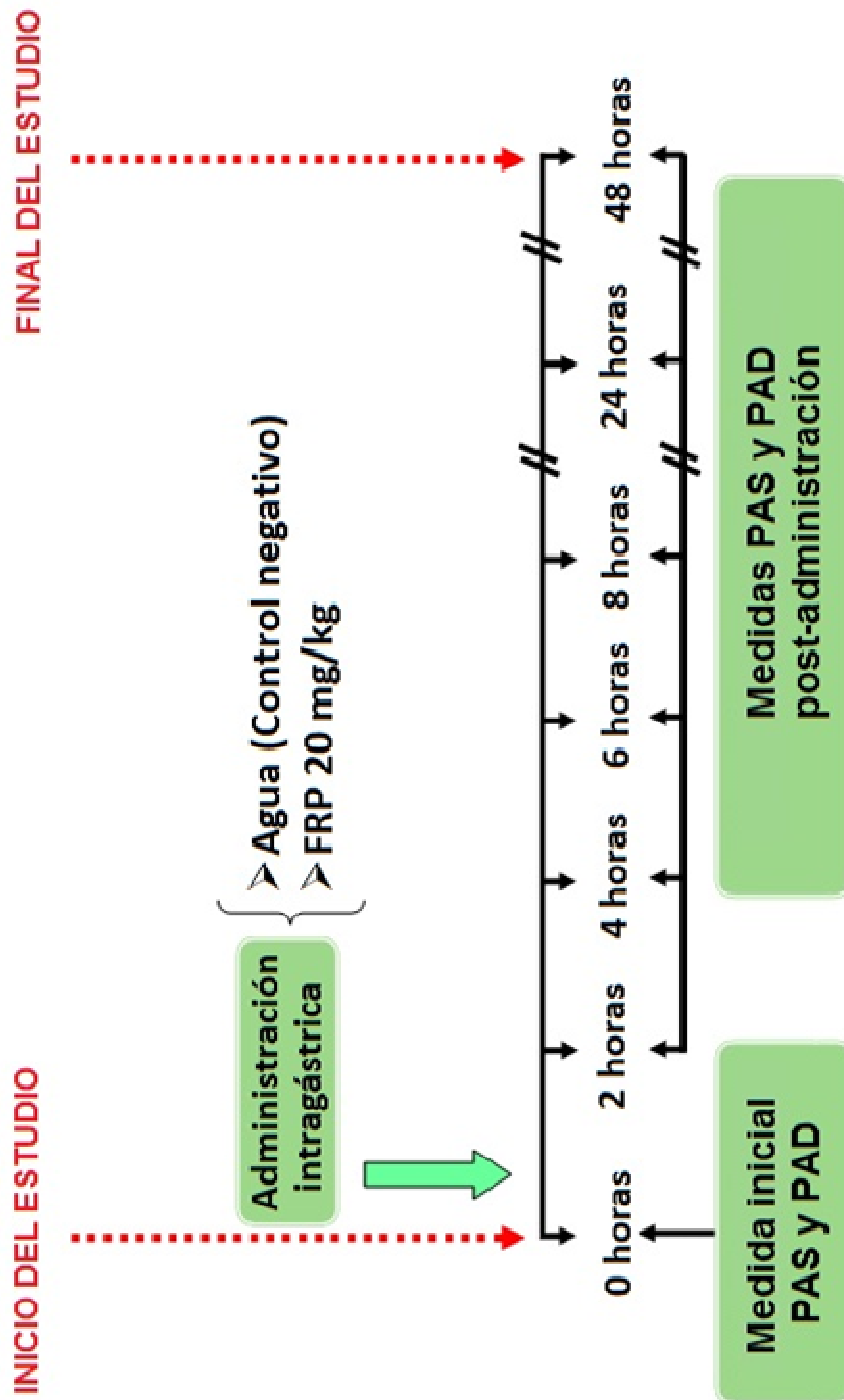


Figura 18. Protocolo experimental para evaluar el efecto sobre la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), de ratas Wistar-Kyoto, de la administración intragástrica de 1 ml de agua (control negativo) o 20 mg/kg de FraxiPure (FRP).

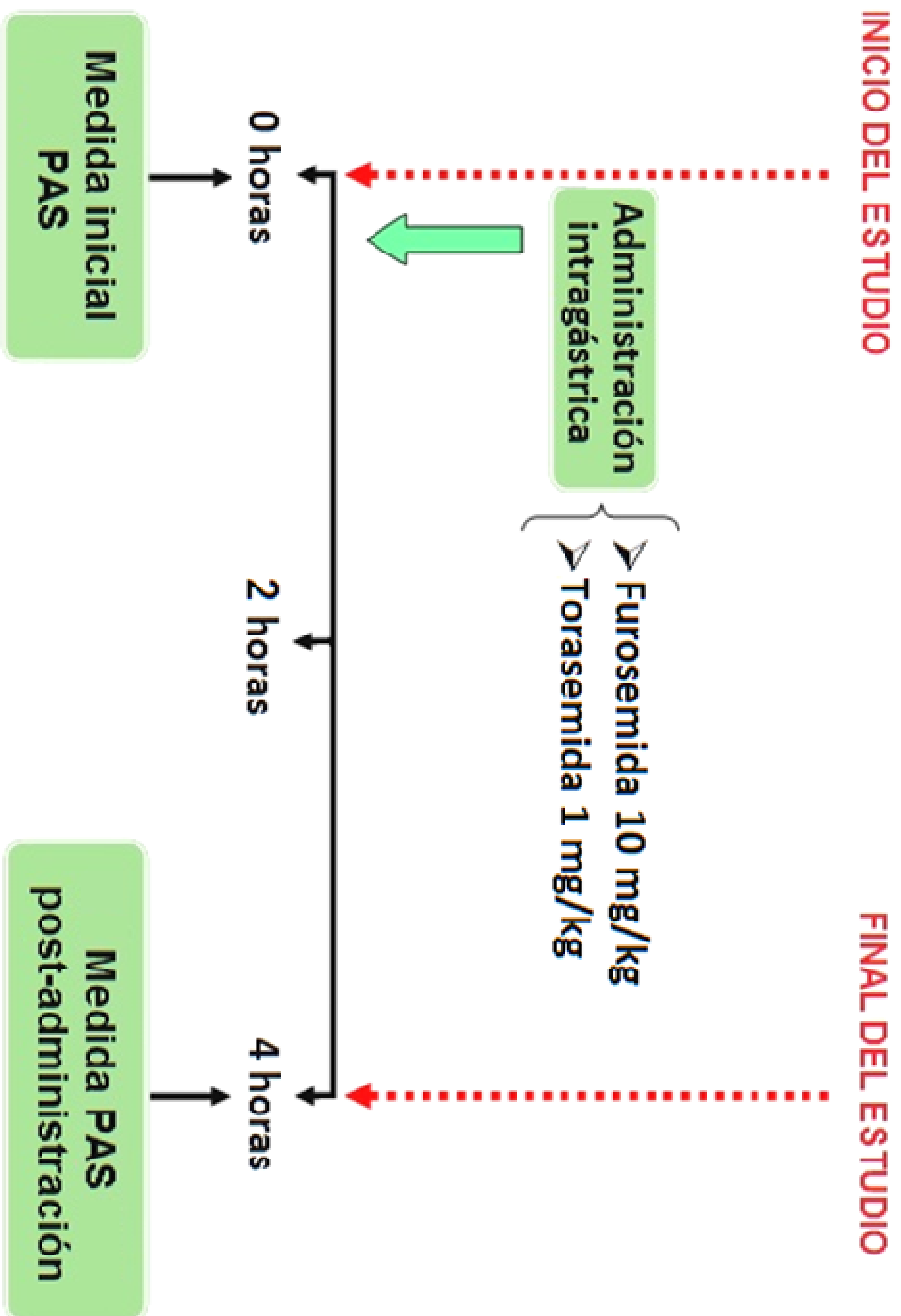


Figura 19. Protocolo experimental para evaluar el efecto sobre la presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas, de la administración intragástrica de 10 mg/kg de Furosemida o de 1 mg/kg de Torasemida.

3.2.2. Efectos sobre la diuresis

Se utilizaron ratas macho SHR de 17-22 semanas de vida, y peso comprendido entre 300 y 350 g. Todos estos animales procedían de Charles River Laboratories S.A. (Barcelona, España). Las ratas SHR permanecieron durante 18 horas en ayunas y, a continuación, evaluamos en ellas el posible efecto diurético de distintos compuestos, de acuerdo a la técnica descrita por Lipschitz et al. en 1943 (Lipschitz et al., 1943). Esta técnica también ha sido utilizada más recientemente por otros investigadores (Ramírez et al., 2006). Tras el período de ayuno, las ratas SHR recibían los siguientes productos, respectivamente, por vía intragástrica: 1 ml de agua (control negativo), 20 mg/kg de FRP, 10 mg/kg de Furosemida, 1 mg/kg de Torasemida o 50 mg/kg de Captopril. Furosemida, y especialmente Torasemida, sirvieron como controles positivos en estos ensayos, ya que son dos diuréticos muy eficaces, que inhiben el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Las dosis de estos compuestos se administraban siempre disueltas en 1 ml de agua destilada. Después de las distintas administraciones, las ratas se colocaban en jaulas metabólicas individuales, ingiriendo agua y dieta estándar para ratas a libre disposición (A04 Panlab, Barcelona, España). Se recolectó y midió el volumen de orina excretada durante 4 horas (Figura 20), para calcular la EVO. La EVO representa el porcentaje del líquido ingerido que se excreta en orina, y se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{EVO} = \frac{\text{Volumen de orina recolectado}}{\text{Volumen de líquido ingerido}} \times 100$$

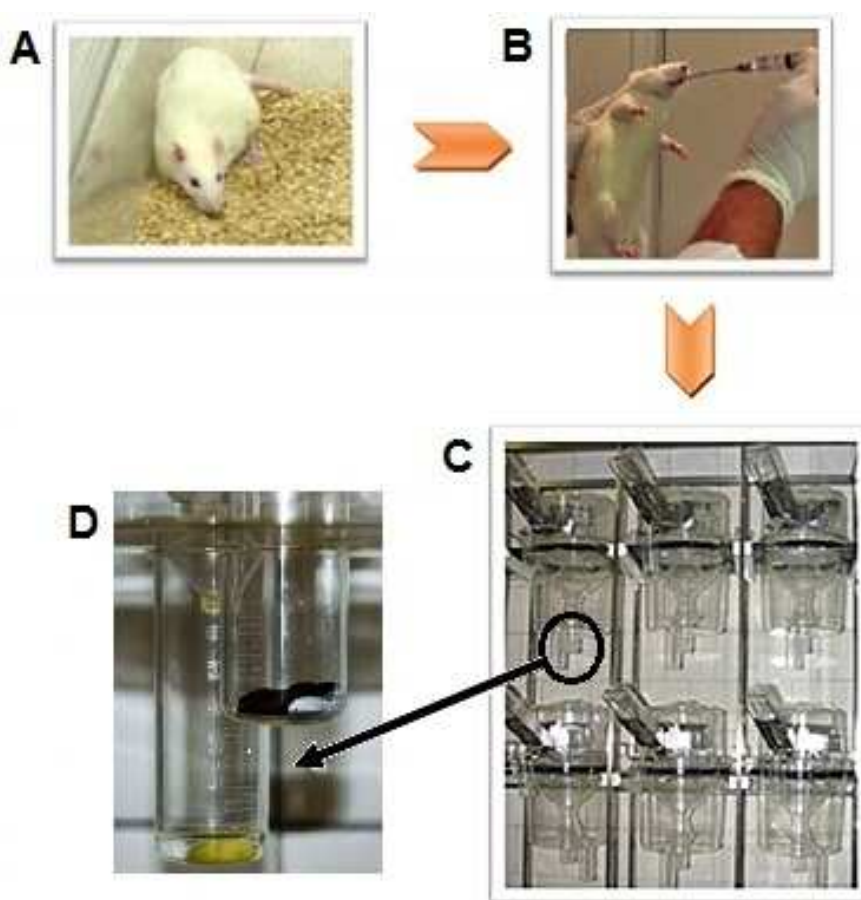


Figura 20. Representación esquemática de las distintas etapas para recolectar y medir el volumen de orina excretada por las ratas, y poder así calcular la excreción volumétrica de orina. A) Las ratas permanecen sin agua y comida durante 18 horas. B) Administración intragástrica del producto. C) Jaulas metabólicas en las que permanecen las ratas con comida y bebida a libre disposición durante 4 horas. D) Recolección de orina.

Tras recolectar la orina, se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular en las ratas SHR, según se describe en el apartado 3.4.2. A continuación, se procedió a realizar determinaciones cuantitativas, tanto urinarias como plasmáticas, de iones (Na^+ , Cl^- y K^+), de calcio y fosfatos y de distintos metabolitos (creatinina, urea y ácido úrico). La metodología utilizada para estas determinaciones se describe en el apartado 3.4.3.

Se calculó después el aclaramiento de creatinina (Acr), expresado como ml/min, de las ratas mediante la siguiente fórmula:

$$Acr = \frac{[Creatinina] \text{ orina}}{[Creatinina] \text{ plasma}} \times \text{Volumen de orina recolectado (4 horas)}$$

La fracción de excreción de un producto (FE) representa el porcentaje del filtrado renal de ese producto que se excreta en la orina. En esta Tesis Doctoral, se determinó la FE de sodio (FENa), cloro (FECl), potasio (FEK), calcio (FECa), fosfato (FEP), urea (FEU) y ácido úrico (FEAU). Para calcular la FE de estos productos se utilizó siempre la siguiente fórmula:

$$FE = \frac{[\text{Producto}] \text{ orina} \times [\text{Creatinina}] \text{ plasma}}{[\text{Producto}] \text{ plasma} \times [\text{Creatinina}] \text{ orina}} \times 100$$

3.2.3. Efectos sobre el balance redox

Se llevaron a cabo experimentos adicionales, que complementaban los ensayos descritos anteriormente. Para estos experimentos, se utilizaron 8 ratas macho SHR, a las que administrábamos, por vía intragástrica, 20 mg/kg de FRP (dosis de este producto que había mostrado mayor efecto sobre la PAS en las ratas SHR), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o 1 ml de agua (control negativo). Después de estas administraciones, extraíamos sangre a los animales de la vena yugular, según se describe en el apartado 3.4.2. La extracción de sangre se realizaba teniendo en cuenta el efecto de estas administraciones sobre la PAS y el momento en el que las mismas tenían mayor eficacia sobre esta variable (ver apartado 4.1.1. de Resultados). Cuando se administraban 20 mg/kg FRP, la extracción tenía lugar 4 horas después de la administración, momento en el que sabíamos

que esta dosis del extracto producía la mayor disminución de la PAS. En las ratas del grupo control negativo la extracción de sangre también se realizó 4 horas después de la administración. Sin embargo, en las ratas del grupo control positivo la extracción se realizó 8 horas después de la administración, ya que sabíamos que en ese momento tenía lugar la máxima disminución de la PAS cuando se administraban 50 mg/kg de Captopril. Como control negativo para los resultados obtenidos en estos animales, se utilizaron también las extracciones realizadas en ratas SHR 4 horas después de haber administrado 1 ml de agua, ya que los valores basales de la PAS de las ratas SHR habían sido semejantes 4 y 8 horas después de esta administración. En todos estos ensayos, siempre medíamos la presión arterial de las ratas antes de la administración, y también antes de la extracción de sangre. La sangre de todos los animales se utilizó para medir la capacidad antioxidante total del plasma y para determinar los niveles plasmáticos de MDA. Las técnicas utilizadas se describen respectivamente en los apartados 3.4.5. y 3.4.6. de esta Tesis Doctoral. La Figura 21 muestra un esquema del protocolo experimental para realizar los anteriores ensayos.

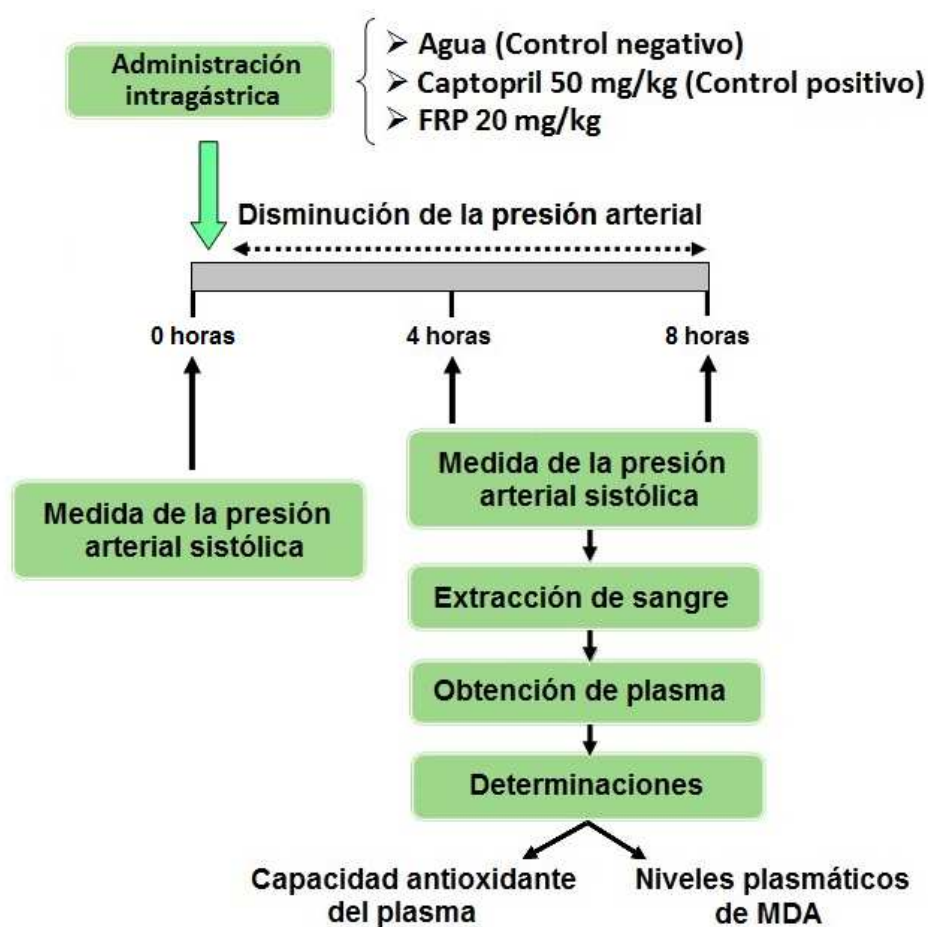


Figura 21. Protocolo experimental para determinar la capacidad antioxidante total del plasma y los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA), de ratas espontáneamente hipertensas a las que administrábamos por vía intragástrica agua (control negativo), 50 mg/kg Captopril (control positivo) o 20 mg/kg de FraxiPure (FRP).

3.3. ESTUDIO PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE FRAXIPURE EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

Para este estudio, se utilizaron ratas macho SHR, con 4 semanas de vida, recién destetadas, procedentes de Charles River Laboratories S.A. (Barcelona, España). Las ratas se colocaron en jaulas de 5 animales, y se mantuvieron con una temperatura ambiental estable de 23 °C y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, ingiriendo agua y dieta sólida estándar para ratas a libre disposición (A04 Panlab, Barcelona, España).

Al comienzo del estudio, las ratas se dividieron en 5 grupos homogéneos, cada uno compuesto por 10 animales (dos jaulas). Los animales de los distintos grupos ingerían, respectivamente y hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento): agua (control negativo), 50 mg/kg/día de Captopril (control positivo) o distintas dosis de FRP (20 mg/kg/día, 40 mg/kg/día y 60 mg/kg/día). Captopril y FRP siempre se administraban diluidos en el agua de bebida. Las soluciones de estos productos se preparaban semanalmente para que las ratas ingiriesen exactamente la cantidad requerida, pero la ingesta de los animales era siempre *ad libitum*.

Al finalizar el período de tratamiento (cuando los animales tenían 20 semanas de vida), la mitad de los animales de cada grupo (5 ratas) se anestesiaron con Ketamina (100 mg/kg de Ketolar 50 mg/ml, i.p.) y Xilacina (12 mg/kg de Rompun 2%, i.p.) (Sigma-Aldrich), y se sacrificaron a continuación por decapitación con guillotina. Se obtuvieron muestras de sangre y muestras de hígado en los animales sacrificados. También se extrajeron las aortas de estos animales. Los restantes animales permanecieron 4 semanas más ingiriendo agua y, al final de este período (período de retirada del tratamiento), se sacrificaron también por decapitación, y se procedió con ellos igual que con los animales sacrificados al finalizar el período de tratamiento.

Se llevaron a cabo medidas semanales de la PAS, desde que las

ratas tenían 6 semanas de vida, hasta que finalizó el período experimental. Para obtener estas medidas, se utilizó la técnica del manguito en la cola, descrita en el apartado 3.4.1. Se controló además semanalmente el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de las ratas durante todo el período experimental. El peso corporal de los animales y el volumen de líquido ingerido durante la última semana, permitían calcular las cantidades de Captopril y FRP que se tenían que diluir en el agua de bebida, durante el período de tratamiento.

La sangre de las ratas sacrificadas se centrifugó para obtener el plasma, y se almacenó a -80 °C, para determinar posteriormente la capacidad antioxidante total de este tejido y los niveles plasmáticos de MDA. La metodología para estas determinaciones se realizó según se describe en los apartados 3.4.5. y 3.4.6.

El tejido hepático de los animales sacrificados se congeló inmediatamente después de extraer este órgano, en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80 °C, para realizar posteriormente determinaciones de MDA y GSH, según se describe en los apartados 3.4.4., 3.4.6. y 3.4.7.

Las aortas de las ratas SHR sacrificadas se utilizaron para montar preparaciones de anillos de este tejido en baños de órganos tradicionales, tal como se describe en el apartado 3.4.8. Tras el correspondiente período de estabilización, y después de haber provocado la contracción del tejido con Metoxamina 10^{-5} M, evaluamos la respuesta endotelio dependiente de acetilcolina en estas preparaciones, tal como se describe también detalladamente en el apartado 3.4.8.

Se muestra a continuación un esquema del protocolo experimental para realizar el estudio descrito en este apartado (Figura 22).

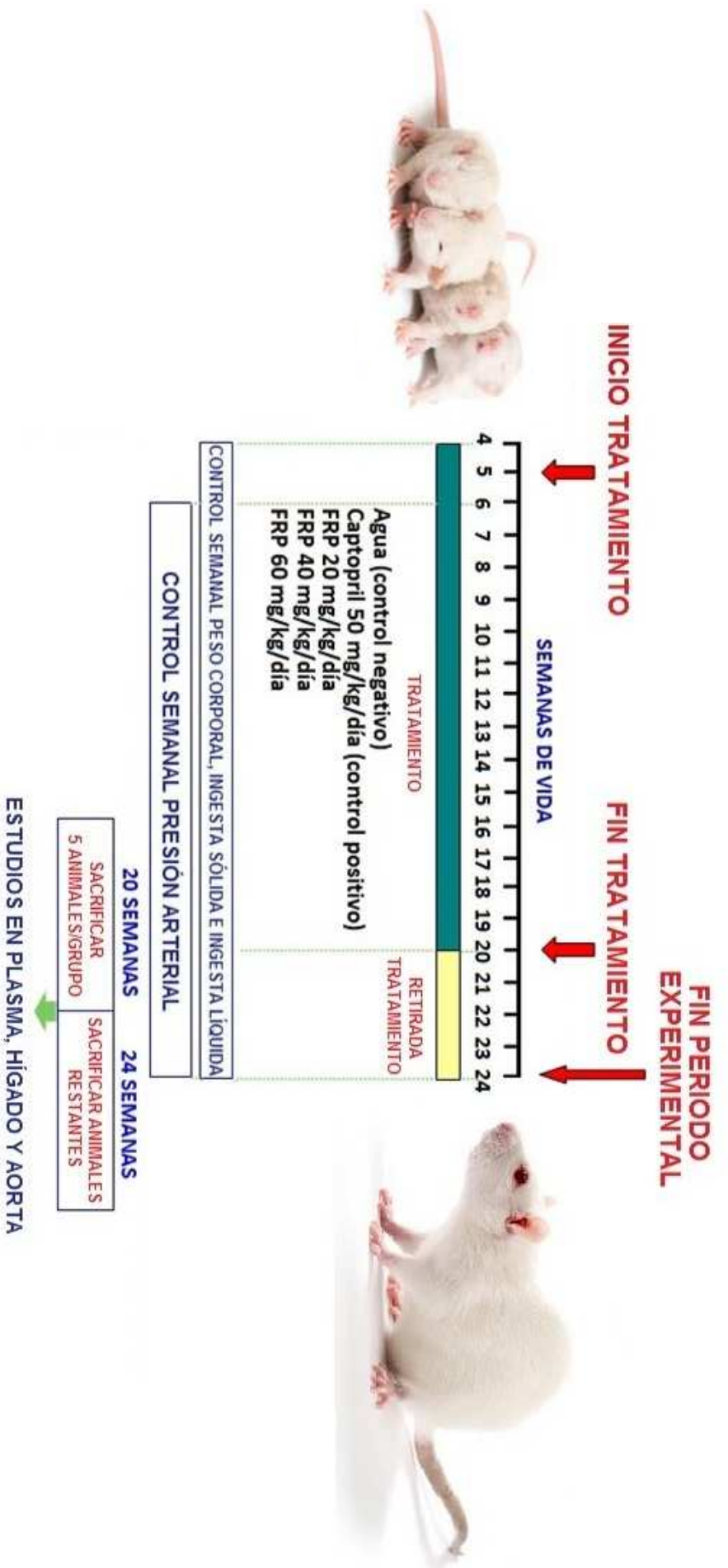


Figura 22. Protocolo experimental para evaluar el efecto de la administración crónica de FraxiPure (FRP) en ratas espontáneamente hipertensas.

3.4. TÉCNICAS UTILIZADAS

3.4.1. Medida de la presión arterial

Las medidas de PAS y PAD se llevaron a cabo mediante una modificación de la técnica del manguito en la cola (tail cuff), originalmente descrita por Buñag (Buñag, 1973) (Figura 23). La medida indirecta de la presión arterial en ratas con este método, es similar a la medida de esta variable con un esfigmomanómetro en humanos, pero las ratas se exponen a una temperatura próxima a los 38 °C para facilitar la dilatación de la arteria caudal, antes de colocarles el manguito y el transductor en la cola. Una vez que se consigue una buena señal de pulso, la obtención de valores fiables de PAS solo depende de la sensibilidad del microprocesador para detectar cambios en el nivel de la onda de pulso. Los valores de la PAS, derivan del análisis de la amplitud de la onda de pulso. La PAS se alcanza cuando se detecta nuevamente la onda de pulso tras colapsar la arteria caudal. Para obtener el valor de la PAS en cada momento, se realizaron 5 medidas, y se obtuvo la media de todas ellas. Además, para asegurar la fiabilidad de la medida, los animales se acostumbraron al procedimiento al menos una semana antes de llevar a cabo el ensayo en cuestión.

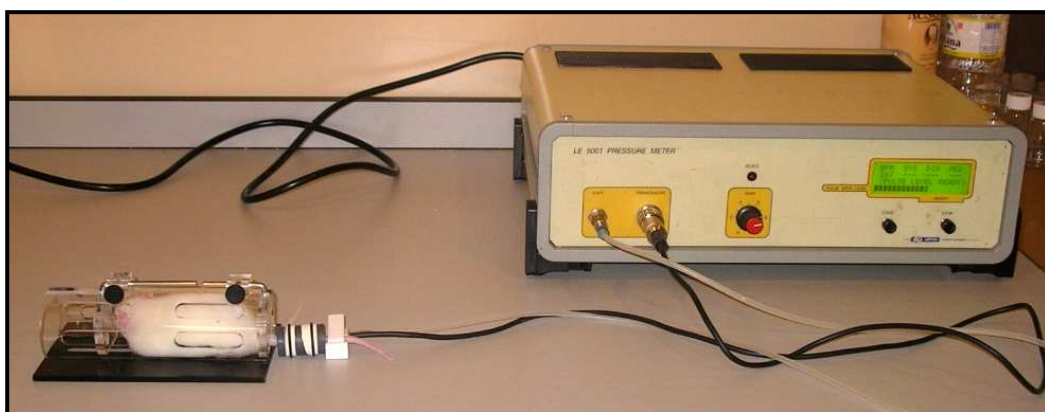


Figura 23. Técnica del manguito en la cola, para la medida indirecta de la presión arterial en ratas (Buñag, 1973).

3.4.2. Extracción de sangre

Únicamente realizamos extracciones de sangre en la vena yugular de las ratas a las que habíamos administrado agua, FRP o Captopril, por vía intragástrica.

La rata se anestesió antes de la extracción con Isoflurano (Sigma-Aldrich), y para ello se utilizó un equipo de anestesia con ventilación asistida. A continuación, se procedió a localizar el recorrido de la vena yugular y, por último, se perforó la piel del animal con una jeringuilla, previamente impregnada con heparina sódica al 5% (5000 UI/ml) (Sigma-Aldrich) (Figura 24). Se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre de cada animal. Después de la extracción, se realizó una suave y firme presión sobre el lugar de la punción, durante al menos 30 segundos, para evitar el sangrado y, finalmente, cuando el animal se recuperaba de la anestesia, se devolvía a su jaula.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos eppendorfs, que contenían heparina sódica al 5% como anticoagulante, y los tubos se mantuvieron en hielo. A continuación, se centrifugó la sangre a 2500 g y 4 °C, durante 30 minutos. Así se obtuvo el plasma, que posteriormente se dividió en alícuotas, y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.



Figura 24. Extracción de sangre a la rata, de la vena yugular.

3.4.3. Determinaciones de distintos analitos en plasma y orina

Se determinó la concentración de distintos iones (Na^+ , Cl^- y K^+), de calcio y fosfatos, y de distintos metabolitos (creatinina, urea y ácido úrico) en la orina y en el plasma de las ratas SHR. Esto permitió establecer el Acr en estos animales y la FE de los restantes analitos.

Determinaciones en muestras de orina

Para las determinaciones en las muestras de orina, utilizamos el analizador Cobas 400 INTEGRA plus (Figura 25). Este sistema utiliza técnicas colorimétricas enzimáticas y electrodos selectivos para iones. La medición se realiza mediante incremento o disminución de absorbancia.



Figura 25. Sistema Cobas 400 INTEGRA plus.

Para determinar la creatinina en las muestras de orina se utilizó un test cinético colorimétrico basado en el método de Jaffé (Jaffé, 1886). Este método establece que en una solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-rojizo con el picrato, y la tasa de formación de colorante es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

Los electrolitos Na^+ , Cl^- y K^+ se determinaron mediante electrodos selectivos de iones que emplean muestras de orina diluidas

automáticamente. Un electrodo selectivo de iones (Ion Selective Electrode = ISE) utiliza las propiedades especiales de ciertas membranas para crear un potencial eléctrico (fuerza electromotriz), que permite medir los iones en solución. El electrodo cuenta con una membrana selectiva que está en contacto con la solución analizada y con una solución interna. La solución interna contiene el ión analizado en una concentración fija. Debido a las características especiales de la membrana, el ión analizado se fija estrechamente a ambos lados de la misma. La diferencia entre la concentración del ión en la solución analizada y en la solución interna determina la fuerza electromotriz de la membrana.

Para determinar calcio en orina se empleó un test fotométrico que se basa en que, en condiciones alcalinas, el calcio reaccionan con el 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA), formando un complejo. El complejo formado reacciona después con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el cambio de absorbancia como consecuencia de esta reacción es directamente proporcional a la concentración de calcio.

La determinación de fosfatos en orina se realizó mediante un test basado en la reacción del anión fosfato con el molibdato de amonio, en presencia de ácido sulfúrico. Como resultado de esta reacción, se forma un complejo de fosfomolibdato de amonio, y la concentración de este complejo, que es directamente proporcional a la concentración de fosfatos, se determina midiendo el aumento de la absorbancia de la muestra a 340 nm (región ultravioleta (UV)).

La urea en orina se determinó por un test cinético UV. En 1965, Talke y Schubert publicaron un método únicamente enzimático para la determinación de la urea, que emplea un sistema enzimático de ureasa/glutamato deshidrogenasa (GLDH). El test se basa en el método de Talke y Schubert, optimizado para su empleo en analizadores automáticos (Talke & Schubert, 1965). En este caso, la urea es hidrolizada por la ureasa, generando NH_4^+ y CO_3^{2-} . A continuación, el NH_4^+ formado reacciona con el α -cetoglutarato y con la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en su forma reducida (NADH), y se forma L-glutamato y NAD en su forma oxidada

(NAD⁺). Esta reacción está catalizada por la GLDH. La velocidad con que la concentración de NADH disminuye es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra. Se midió por lo tanto la reducción de la absorbancia debida al consumo de NADH. La lectura fotométrica final tiene lugar a una longitud de onda de 340 nm, que se encuentra en la región UV.

Para la determinación de ácido úrico en orina se utilizó la enzima uricasa para oxidar este metabolito, eliminando así las interferencias intrínsecas del proceso químico de oxidación. La uricasa puede emplearse en métodos que determinan el consumo del ácido úrico por mediciones UV, pero también puede utilizarse en combinación con otras enzimas para realizar un test colorimétrico. En este caso, el test fue colorimétrico y se basó en el método descrito por Praetorius y Poulsen, con ligeras modificaciones (Praetorius & Poulsen, 1953). Para la determinación, el peróxido formado por la oxidación del ácido úrico reacciona en presencia de peroxidasa (POD), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina (TOOS) y 4-aminofenazona, para formar el colorante quinona-diimina. La intensidad cromática de la quinona-diimina formada es directamente proporcional a la concentración de ácido úrico, y se determina esta concentración midiendo el incremento de la absorbancia a 552 nm.

Determinaciones en muestras de plasma

Para las determinaciones en las muestras de plasma, se utilizó el analizador Roche/Hitachi MODULAR P / MODULAR D (MODULAR ANALYTICS) (Figura 26). El sistema está completamente automatizado y tiene una unidad de procesamiento de muestras ("Core Unit") y un software de gestión inteligente de los procesos ("Intelligent Process Management"). El sistema combina en realidad gran variedad de módulos analíticos, que facilitan la fusión completa de la química clínica, la inmunoquímica homogénea y la inmunoquímica heterogénea. Las determinaciones en plasma se llevan a cabo en un área concreta (MODULAR ANALYTICS SWA).



Figura 26. Analizador Roche/Hitachi MODULAR ANALYTICS.

La determinación de creatinina en plasma fue semejante a la determinación de creatinina en orina y se basó también en el método de Jaffé (Jaffé, 1886). Sin embargo, en este caso se utiliza un blanco para minimizar la interferencia por bilirrubina.

Para la determinación cuantitativa de Na^+ , Cl^- y K^+ en plasma se emplea también un electrodo selectivo de iones, al igual que para las determinaciones de estos iones en orina.

La determinación de calcio en plasma fue semejante a la determinación de calcio en orina. También en este caso el calcio reacciona en condiciones alcalinas con NM-BAPTA, formando un complejo, que posteriormente reacciona con EDTA, y el cambio de absorbancia en la muestra es directamente proporcional a la concentración de calcio.

La determinación de fosfatos en plasma fue semejante a la determinación de fosfatos en orina. En este caso, el test también está basado en la reacción del anión fosfato con el molibdato de amonio, en presencia de ácido sulfúrico. La concentración del complejo de fosfomolibdato de amonio formado es directamente proporcional a la concentración de fosfatos y se determina midiendo el aumento de la absorbancia de la muestra a 340 nm (región UV).

La determinación de urea en plasma fue semejante a la determinación de urea en orina y se basó también en el método de Talke y Schubert (Talke & Schubert, 1965).

La determinación de ácido úrico en plasma fue semejante a la

determinación de ácido úrico en orina. Se utilizó por lo tanto el método colorimétrico descrito por Praetorius y Poulsen, con ligeras modificaciones (Praetorius & Poulsen, 1953). La intensidad cromática del colorante formado es también en este caso directamente proporcional a la concentración de ácido úrico, y la concentración de este metabolito se determina midiendo el incremento de la absorbancia a 552 nm.

3.4.4. Homogeneización del tejido hepático y determinación de proteínas

La extracción del hígado en las ratas se realizó inmediatamente después de haber sacrificado a estos animales. El tejido hepático se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a una temperatura de -80 °C hasta su posterior utilización.

Para proceder a la homogeneización del tejido hepático, separamos un fragmento del total del órgano, de aproximadamente 1 g de peso. Mezclamos este fragmento de hígado con 1 ml de solución tampón fosfato (PBS) (pH 7,4) (Sigma-Aldrich), y lo trituramos utilizando un homogeneizador Ultra turrax Modelo T-50 Basic (Instrumentación Científico Técnica S.L., Madrid, España). El homogeneizado se conservó en hielo para mantenerlo a una temperatura aproximada de 4 °C, y posteriormente se centrifugó a esta temperatura, a una velocidad de 5000 g, durante 20 minutos. A continuación, recogimos el sobrenadante y lo utilizamos para determinar los niveles de MDA y de GSH que había en el tejido hepático, según los métodos descritos en los apartados 3.4.6. y 3.4.7.

Para determinar el contenido de proteínas del sobrenadante obtenido tras la homogeneización del tejido hepático, se utilizó la técnica espectrofotométrica descrita por Lowry (Lowry et al., 1951) con algunas modificaciones. Para ello, empleamos el ensayo diagnóstico de Biorad (DC protein assay, Biorad, USA). Se utilizó una placa multipocillos y en cada pocillo se añadieron 20 µl de la muestra diluida y 20 µl de la mezcla de los

reactivos A (sustancia alcalina de tartrato sódico) y S (sustancia surfactante), en una proporción 1000:20. Asimismo, se añadieron 160 µl del reactivo B (fluorescente). La placa se incubó a continuación durante 15 minutos, a 37 °C, en oscuridad. Se midió después la absorbancia a 750 nm en un espectofotómetro (Multiscan Ascent, España), tomando como referencia un blanco con 20 µl de agua destilada. Se realizó una curva de calibrado con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 µg/ml de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich, USA).

3.4.5. Determinación de la capacidad antioxidante del plasma

La capacidad antioxidante del plasma, se evaluó determinando la actividad que tiene este tejido para absorber y neutralizar radicales peroxilo (ORAC). El ensayo que utilizamos está basado en el método descrito por Ou et al. (2001), que posteriormente se modificó por Manso et al. (2008).

En este ensayo, se añade fluoresceína a la muestra y también 2,2'-Azobis-(2-metilpropionamida) (APPH), que es un generador de radicales libres. Este compuesto oxida la fluoresceína, de forma que esta pierde su fluorescencia. La curva patrón se consigue con 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX), que es un análogo estable de la vitamina E.

El volumen final de las muestras para las determinaciones del ensayo era siempre de 200 µl, que contenían 20 µl de TROLOX a diferentes concentraciones (1-8 µM) en el caso de la curva patrón, 20 µl de solución de PBS (pH 7,4) en el caso del blanco, y 20 µl de plasma en el caso de las muestras problema. A cada muestra, se le añadían 120 µl de fluoresceína disódica 70 nM (Sigma-Aldrich) y 60 µl de APPH 12 mM (Sigma-Aldrich). Todas las muestras, tanto las de la curva patrón, como la del blanco y las de las diferentes muestras de plasma, se triplicaron. Las muestras y los patrones se disolvieron siempre en PBS. La fluoresceína disódica, que actuó como sustrato oxidable, se preparó en el mismo tampón, y se almacenó en

condiciones de oscuridad a 4 °C, durante un máximo de 4 semanas. Asimismo, el compuesto AAPH 12 mM se disolvía también en PBS y esta solución, se preparaba justo antes del análisis. El análisis se realizó en microplacas negras de 96 pocillos (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania), y la lectura se llevó a cabo en un lector de placas (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania), con un filtro de excitación de 490 nm y un filtro de emisión de 520 nm, a una temperatura de 37 °C, durante 97 minutos. Se utilizó el programa Fluorstar Control para el registro. Los valores de ORAC se expresaron como su equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma.

3.4.6. Determinación de malonildialdehído en plasma y tejido hepático

Utilizamos el ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Rodríguez-Martínez & Ruiz-Torres, 1982), con ligeras modificaciones (Mendes et al., 2009), para determinar los niveles de malonildialdehído (MDA) en el plasma y en el tejido hepático de las ratas SHR. El plasma y el sobrenadante procedente de la homogeneización del tejido hepático se mantuvieron a 60 °C, durante 30 minutos, con NaOH 10 N (Sigma-Aldrich) en una proporción 1:10 (vol/vol). Posteriormente, ambas muestras se mezclaron con ácido tricloroacético al 20% en HCl 0,6 M (1:1 vol/vol), y los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 minutos, para provocar la precipitación de los componentes proteicos de las distintas muestras, y evitar así posibles interferencias. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 1500 g, durante 15 minutos. A continuación, se añadió el TBA (120 mM en Tris 260 mM, pH=7) al sobrenadante en una proporción 1:5 (vol/vol), y la mezcla se calentó a 97 °C, durante 30 minutos. La reacción entre MDA y TBA produce un pigmento estable de color rosa, que es un aducto, con un coeficiente de absorción molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en el espectro visible (535 nm). La absorbancia se determinó utilizando un lector de placas HTS

Multi-Modal de Microplacas Synergy NEO (BioTek, Distribuidor Izasa S.A. Alcobendas, Madrid). Las concentraciones de MDA se expresaron respectivamente como nmol de MDA/ml de plasma, o como nmol MDA/mg proteína.

3.4.7. Determinación de glutatión reducido en tejido hepático

Los niveles de GSH en el hígado se determinaron por el método fluorimétrico del monoclorobimane (Kamencic et al., 2000).

El volumen final de las muestras para las determinaciones del ensayo era siempre de 100 μ l, que contenían 90 μ l del sobrenadante de tejido hepático o 90 μ l de una solución de GSH (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) en PBS (pH 7,4) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), a diferentes concentraciones (0,001-10 mM), y 10 μ l de una solución de glutatión S-transferasa (GST) (1 U/ml), obtenida a partir de hígado de caballo (Sigma-Aldrich, USA), y monoclorobimane (Fluka Biochemical, Suiza) (1 mM). Todas las muestras, tanto el patrón, como las diferentes muestras del sobrenadante hepático, se prepararon por duplicado. El análisis se realizó en microplacas negras de 96 pocillos (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania). La placa se incubó a temperatura ambiente, protegida de la luz, durante 30 minutos. Durante este tiempo, tiene lugar una reacción en la que el glutatión se une al monoclorobimane, generando un complejo fluorescente. Esta reacción está catalizada por la GST. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a cuantificar la concentración del complejo, y por lo tanto de GSH, mediante un fluorímetro (Multiskan Ascent, Labsystems, España) a una longitud de onda de excitación de 355 nm y de emisión de 460 nm. Los valores de GSH en hígado se expresan como μ mol GSH/ μ g proteína.

3.4.8. Preparaciones de anillos de aorta en baños de órganos

Una vez sacrificadas las ratas, se extrajo la aorta torácica de estos animales y se depositó este tejido en un recipiente con solución Krebs-Henseleit, que tenía la siguiente composición (mM): NaCl (118,2); KCl (4,7); CaCl_2 (2,5); KH_2PO_4 (1,2); MgSO_4 (1,2); NaHCO_3 (25); y glucosa (10); pH=7,3. La arteria se limpió de tejido graso y tejido conectivo, y se cortó en anillos de 3-4 mm de ancho, que permanecieron siempre en solución de Krebs-Henseleit, burbujeada con gas carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2), hasta que se montaron en los baños de órganos.

Los anillos de aorta se montaron en baños de órganos tradicionales, de 10 ml, que contenían también solución de Krebs-Henseleit, burbujeada con gas carbógeno. Esta solución se mantenía a 37 °C durante el ensayo. Dentro del baño, los anillos se situaron entre dos ganchos de acero inoxidable con forma de U. El gancho inferior se colocaba en posición invertida, después de haberlo introducido por la luz del anillo, y se fijaba en la parte inferior del baño de órganos. El gancho superior se introducía también por la luz del anillo y se desplazaba para dar tensión a la preparación. Este gancho móvil estaba acoplado a un transductor de fuerza isométrico de la casa comercial Panlab (Dynamometer UF1, España), que a su vez estaba acoplado a un amplificador de la misma casa (Ampo 16/2, España). El amplificador envía la señal hasta el equipo informático, a través de una interfaz de la casa comercial Leticia (Interface LE 60-100L/H, EEUU), y un programa informático adecuado (eDAQ Chart versión 5.2, Panlab, España) permite obtener las medidas digitales de la contracción o relajación del anillo, así como visualizar estas respuestas en la pantalla de un ordenador y reproducirlas mediante una impresora (Figura 27).

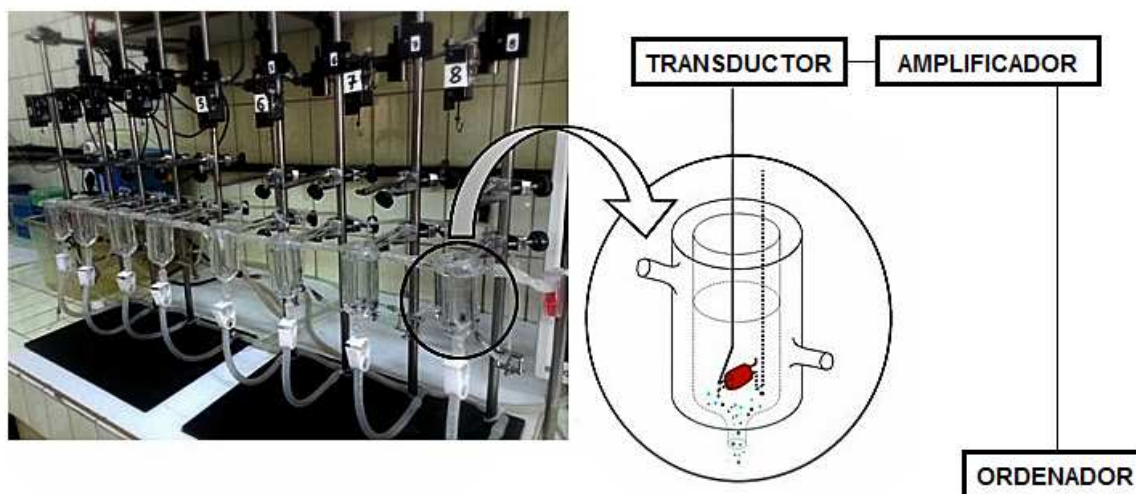


Figura 27. Esquema de los baños de órganos utilizados para llevar a cabo los ensayos con anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas.

Los anillos se sometieron a una tensión inicial de 2,5 g cuando se montaron en los baños, y se realizaron después varios lavados con solución Krebs-Henseleit cada 15-20 minutos, durante un período de 60-80 minutos, hasta que finalmente la tensión se estabilizó en valores próximos a los 2,0 g. A continuación, se provocó la contracción de los anillos, exponiéndolos a una concentración 80 mM de KCl. Esta contracción permitió comprobar la funcionalidad arterial. Cuando esta contracción alcanzó su altura máxima (aproximadamente 20-30 minutos después de la administración de KCl), las preparaciones se lavaron con solución Krebs-Henseleit, hasta que recuperaron la tensión basal inicial antes de la administración. Posteriormente, los anillos se expusieron a una concentración 10^{-5} M de Metoxamina (Sigma-Aldrich), y cuando la contracción provocada por este compuesto alcanzó la altura máxima, el tejido se expuso a concentraciones crecientes de acetilcolina (de 10^{-9} M a 10^{-5} M) (Sigma-Aldrich) (Figura 28). Se llevaron a cabo un mínimo de 5 ensayos homogéneos, y cada uno de los anillos utilizados para estos ensayos procedía de un animal distinto.

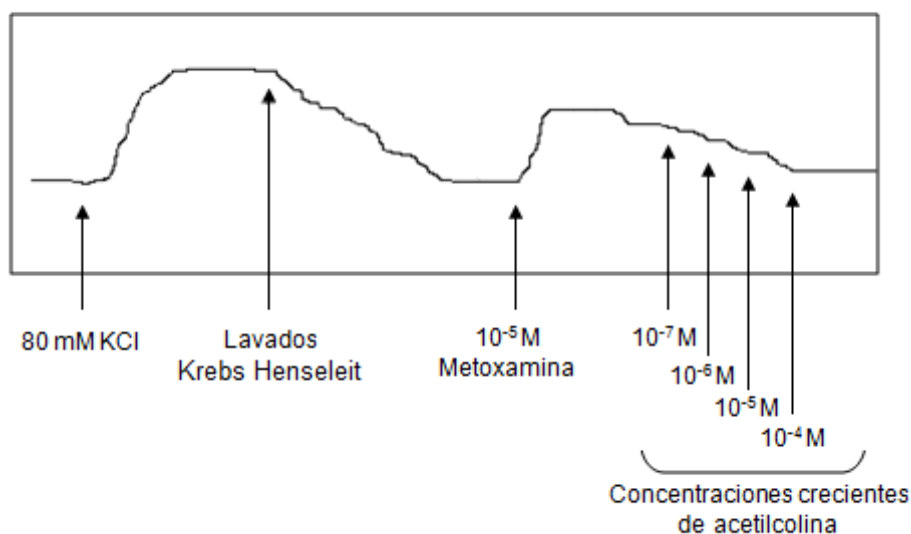


Figura 28. Esquema del protocolo para evaluar la respuesta endotelio dependiente de acetilcolina en anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados con las ratas o con sus muestras biológicas (plasma, tejido hepático o aorta), se expresaron siempre cómo la media \pm el error estándar de la media (EEM), para un mínimo de 5 ensayos homogéneos.

Los datos obtenidos se analizaron usualmente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguido del test de Bonferroni. Para analizar algunos resultados, se utilizó sin embargo el test de la T de Student para datos no apareados. Se consideró siempre significativa la diferencia para valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE FRAXIPURE EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

4.1.1. Efectos sobre la presión arterial

Las ratas SHR utilizadas para evaluar el efecto de la administración aguda de FRP tenían valores basales de PAS y de PAD de $211,9 \pm 4,0$ mm Hg y $173,8 \pm 7,5$ mm Hg, respectivamente ($n=30$). La administración intragástrica de 1 ml de agua (control negativo) no causó ningún efecto sobre la presión arterial de estos animales, y los valores de esta variable fueron siempre semejantes después de dicha administración. La administración intragástrica de 1 ml de agua tampoco modificó la presión arterial de las ratas WKY. Sin embargo, la administración intragástrica de 50 mg/kg de Captopril (control positivo) causó una marcada disminución de la PAS y de la PAD en las ratas SHR. La máxima disminución de la PAS ($-38,56 \pm 4,49$ mm Hg) se observó 8 horas después de administrar el fármaco, pero la disminución máxima de la PAD ($-52,63 \pm 17,07$ mm Hg) se observó un poco antes, 6 horas después de la administración de este compuesto. FRP también disminuyó la PAS y la PAD de las ratas SHR, pero los descensos de estas variables causados por el extracto fueron menos acentuados que los causados por Captopril. La máxima disminución de la PAS producida por FRP ($-26,88 \pm 3,05$ mm Hg) se observó 4 horas después de administrar 20 mg/kg del extracto, y cabe señalar que esta disminución de la PAS fue semejante a la que se observaba 4 horas después de haber administrado 50 mg/kg de Captopril ($-29,67 \pm 5,40$ mm Hg). Cuando se administraba FRP, la máxima disminución de la PAD ($-39,16 \pm 12,1$ mm Hg) se observó sin embargo 4 horas después de administrar 30 mg/kg del extracto. No se apreciaron diferencias significativas entre esta disminución de la PAD y la producida por 20 mg/kg del extracto ($-28,04 \pm 14,32$ mm Hg). Se consideró en realidad que esta última dosis de FRP era la más efectiva

en las ratas SHR. La administración intragástrica de dosis más bajas de FRP (5 mg/kg y 10 mg/kg) también causó una disminución de la presión arterial en las ratas SHR. Considerando los descensos de la PAS que ocasionaban estas dosis del extracto ($-17,69 \pm 3,61$ mm Hg y $-19,03 \pm 4,62$ mm Hg, respectivamente) y los correspondientes descensos de la PAD ($-21,21 \pm 20,27$ mm Hg y $-22 \pm 25,1$ mm Hg, respectivamente), se puede afirmar que el efecto antihipertensivo de FRP en las ratas SHR es claramente dosis dependiente hasta que se alcanza la dosis de 20 mg/kg. Paradójicamente, la dosis más alta de este extracto utilizada (40 mg/kg) no presentó ningún efecto sobre la PAS de las ratas SHR. Además, esta dosis de FRP únicamente causó una disminución de la PAD en estos animales que fue algo menor ($-20,18 \pm 13,06$ mm Hg) que las disminuciones de esta variable producidas por 20 mg/kg o 30 mg/kg de FRP. En realidad, la disminución de la PAD producida por 40 mg/kg de FRP fue semejante a la disminución de la PAD que causaban 5 mg/kg de FRP ($-21,21 \pm 20,27$) o 10 mg/kg de FRP ($-18,81 \pm 11,30$). Los valores iniciales de la PAS y de la PAD no se recuperaron hasta 48 horas después de haber administrado las dosis efectivas de FRP o Captopril (Figura 29).

Las Tablas 4 y 5 muestran respectivamente los valores de la PAS y de la PAD que presentaban las ratas SHR antes y después de la administración de las diferentes dosis de FRP.

La dosis de 20 mg/kg de FRP, considerada la dosis más efectiva de FRP en las ratas SHR, no modificó ni la PAS ni la PAD de las ratas normotensas WKY (Figura 30).

La Tabla 6 muestra los valores de la PAS y de la PAD que presentaban las ratas WKY antes y después de la administración de agua o 20 mg/kg de FRP.

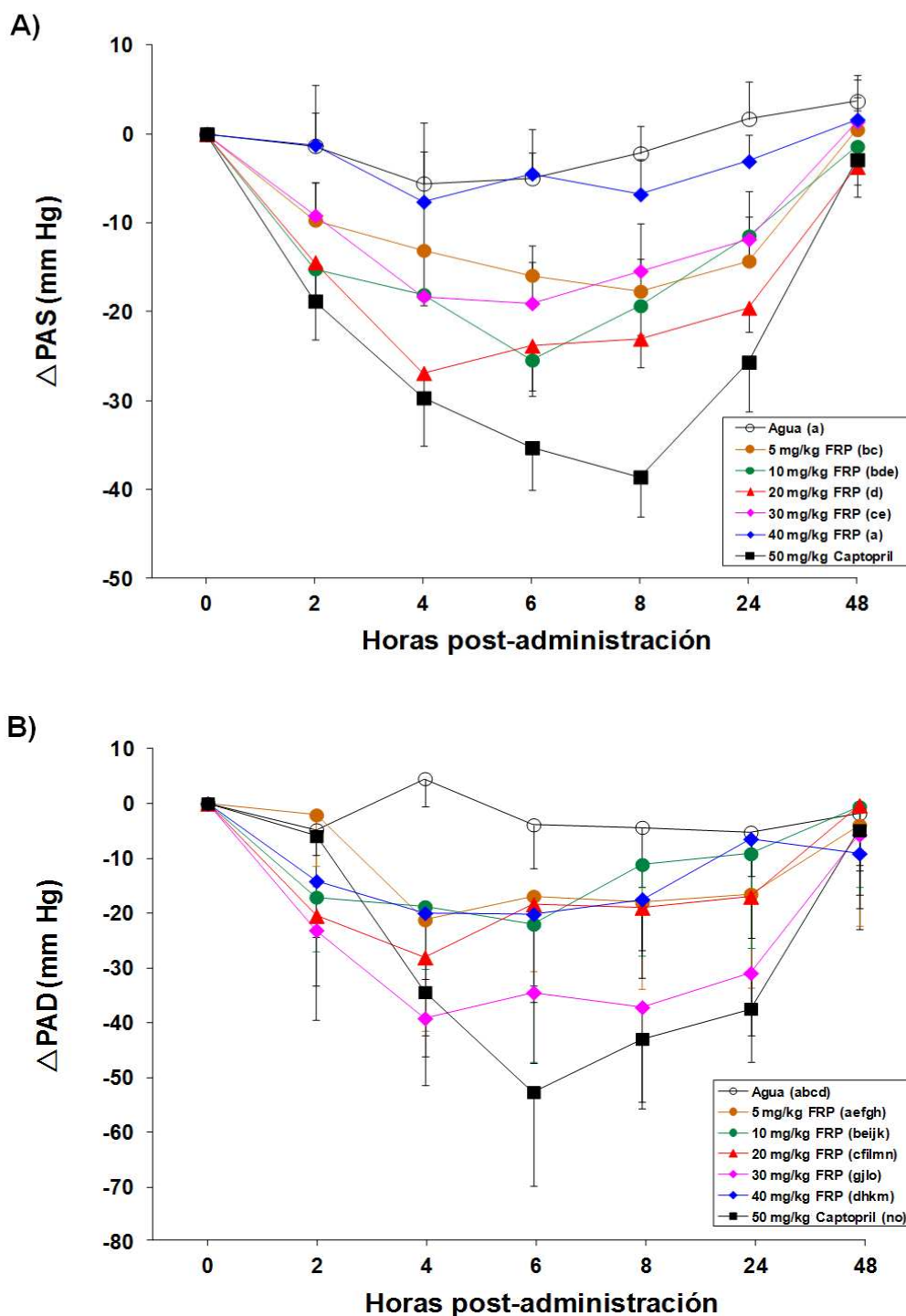


Figura 29. Disminuciones de la presión arterial sistólica (PAS) (A) y de la presión arterial diastólica (PAD) (B) en ratas espontáneamente hipertensas, después de la administración intragástrica de agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 5 mg/kg (●), 10 mg/kg (●), 20 mg/kg (▲), 30 mg/kg (◆) y 40 mg/kg (◆). Los datos representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.

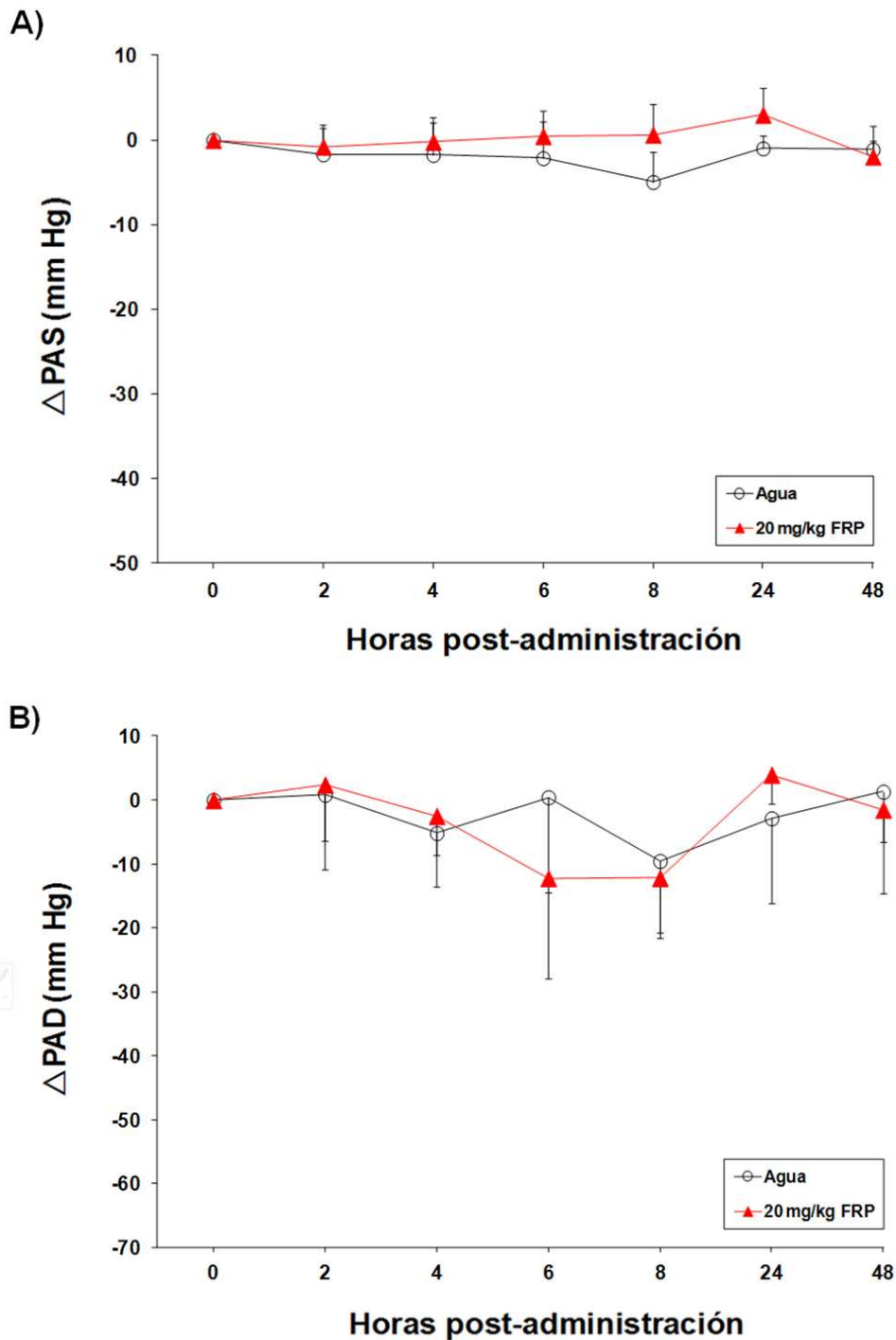


Figura 30. Modificación de la presión arterial sistólica (PAS) (A) y de la presión arterial diastólica (PAD) (B) producida en ratas Wistar-Kyoto, después de la administración intragástrica de agua (○) o 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (▲). Los datos representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.

Tabla 4. Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) de ratas espontáneamente hipertensas, en distintos momentos después de la administración de agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales.

Horas post-administración	AGUA (n=10)	CAPTOPRIL 50 mg/kg (n=10)	FRP				
			5 mg/kg (n=8)	10 mg/kg (n=8)	20 mg/kg (n=8)	30 mg/kg (n=8)	40 mg/kg (n=8)
0	212,9 ± 3,2	224,3 ± 3,6	224,0 ± 3,9	217,0 ± 1,7	218,3 ± 3,1	221,6 ± 4,5	220,7 ± 3,1
2	211,6 ± 3,0	205,5 ± 3,3	214,3 ± 3,2	201,8 ± 2,9	203,9 ± 4,1	212,4 ± 2,9	219,5 ± 6,2
4	208,3 ± 3,8	194,6 ± 4,2	210,9 ± 4,5	200,6 ± 1,9	191,4 ± 2,3	203,3 ± 4,3	213,1 ± 8,5
6	209,9 ± 3,0	189,0 ± 3,8	208,1 ± 3,1	192,6 ± 4,1	194,5 ± 5,6	202,6 ± 4,1	216,4 ± 4,0
8	210,7 ± 3,8	185,7 ± 3,5	206,3 ± 2,5	197,7 ± 3,7	195,3 ± 3,1	206,2 ± 7,0	213,9 ± 3,5
24	214,6 ± 5,5	198,6 ± 4,7	209,7 ± 3,6	205,5 ± 3,0	198,8 ± 1,8	209,8 ± 4,6	217,6 ± 3,8
48	216,6 ± 1,8	222,5 ± 3,3	222,9 ± 3,1	213,9 ± 2,8	214,6 ± 3,2	218,3 ± 4,2	222,3 ± 2,5

Tabla 5. Valores de presión arterial diastólica (PAD) (mm Hg) de ratas espontáneamente hipertensas, en distintos momentos después de la administración de agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales.

Horas post-administración	AGUA (n=10)	CAPTOPRIL 50 mg/kg (n=10)	FRP				
			5 mg/kg (n=8)	10 mg/kg (n=8)	20 mg/kg (n=8)	30 mg/kg (n=8)	40 mg/kg (n=8)
0	171,5 \pm 3,2	178,3 \pm 9,0	173,0 \pm 14,9	167,4 \pm 12,2	140,2 \pm 12,4	192,13 \pm 5,4	192,0 \pm 7,0
2	169,2 \pm 3,0	172,4 \pm 7,6	170,9 \pm 12,1	150,3 \pm 10,5	119,8 \pm 19,9	169,0 \pm 8,3	177,8 \pm 17,4
4	178,5 \pm 3,8	143,9 \pm 13,0	147,0 \pm 19,2	160,5 \pm 9,6	112,2 \pm 14,9	154,4 \pm 11,7	172,0 \pm 13,1
6	170,1 \pm 3,0	125,7 \pm 15,6	156,1 \pm 18,2	145,0 \pm 17,6	121,9 \pm 10,6	157,7 \pm 12,7	171,8 \pm 10,2
8	169,6 \pm 3,8	135,4 \pm 15,3	155,0 \pm 10,5	156,3 \pm 11,1	121,3 \pm 17,5	155,0 \pm 13,9	174,6 \pm 9,7
24	167,2 \pm 5,5	140,9 \pm 15,6	156,5 \pm 14,1	158,2 \pm 10,3	123,3 \pm 12,6	161,2 \pm 8,3	186,4 \pm 6,0
48	169,7 \pm 1,8	187,6 \pm 6,9	175,1 \pm 12,2	167,1 \pm 9,2	139,9 \pm 12,7	178,4 \pm 9,3	185,6 \pm 3,8

Tabla 6. Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) de ratas Wistar-Kyoto, en distintos momentos después de la administración de agua o 20 mg/kg de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales.

Horas post-administración	PAS (mm Hg)		PAD (mm Hg)	
	AGUA (n=10)	FRP 20 mg/kg (n=8)	AGUA (n=10)	FRP 20 mg/kg (n=8)
0	159,7 \pm 2,1	156,7 \pm 3,9	102,7 \pm 2,1	94,1 \pm 6,6
2	158,0 \pm 4,3	156,0 \pm 3,2	103,5 \pm 3,2	96,5 \pm 7,2
4	157,9 \pm 3,9	156,5 \pm 5,0	97,5 \pm 5,0	91,6 \pm 5,9
6	157,7 \pm 4,8	157,2 \pm 3,9	103,1 \pm 3,9	82,9 \pm 12,6
8	154,7 \pm 4,5	157,4 \pm 3,0	93,2 \pm 3,0	80,9 \pm 6,7
24	158,7 \pm 2,3	159,7 \pm 2,9	99,8 \pm 2,9	94,2 \pm 5,7
48	158,6 \pm 3,5	154,8 \pm 4,2	104,0 \pm 2,9	92,6 \pm 8,3

Como ya señalamos al final del apartado 3.2.1. de Material y Métodos, también se llevaron a cabo medidas de la PAS en las ratas SHR antes de la administración intragástrica de 1 mg/kg de Torasemida, antes de la administración intragástrica de 10 mg/kg de Furosemida, y 4 horas después de estas administraciones. Con este margen post-administración, 1 mg/kg de Torasemida ocasionó una disminución significativa de la PAS en las ratas SHR ($-15,94 \pm 3,84$ mm Hg), pero esta disminución fue algo menos acusada que la producida por 20 mg/kg de FRP en estos animales ($-26,88 \pm 3,05$ mm Hg). No se apreciaron sin embargo diferencias significativas entre estos descensos de la PAS. Los efectos antihipertensivos de 20 mg/kg de FRP y de 1 mg/kg de Torasemida en las ratas SHR fueron en cualquier bastante parecidos. Cabe además recordar que, 4 horas post-administración, se observaban también descensos de la PAS semejantes con 20 mg/kg de FRP y con 50 mg/kg de Captopril. Por el contrario, 4 horas después de la administración de 10 mg/kg de Furosemida se observaban valores de PAS en las ratas SHR semejantes a los que se observaban 4 horas después de haber administrado agua a estos animales.

La Figura 31 muestra los descensos de la PAS producidos en ratas SHR 4 horas después de la administración de todos los compuestos mencionados en el párrafo anterior, en las dosis señaladas.

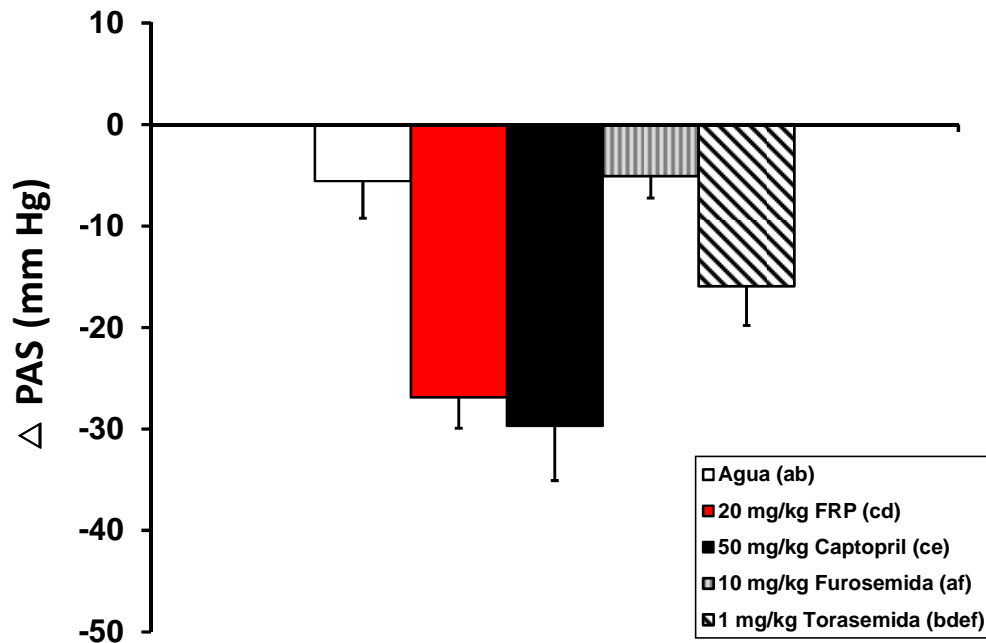


Figura 31. Disminución de la presión arterial sistólica (PAS) producida en ratas espontáneamente hipertensas, 4 horas después de la administración intragástrica de agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▨) o 1 mg/kg de Torasemida (▩). Los datos representan la media \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

4.1.2. Efectos sobre la diuresis

La EVO de las ratas SHR tratadas con 20 mg/kg de FRP aumentó significativamente. Esta dosis del extracto causó un ligero aumento en la FE de distintos iones. Concretamente, aumentó algo la FENa y la FECl, pero no existió diferencia significativa entre estos valores y los correspondientes valores del grupo control negativo. Por el contrario, la administración de 20 mg/kg de FRP ocasionó una disminución significativa de la FEK y la FEP en las ratas SHR. Esta administración también disminuyó ligeramente la FECa de estos animales, pero la FEAU fue muy similar en el grupo de ratas tratadas con 20 mg/kg de FRP y en el grupo de ratas control negativo.

La EVO fue también mayor en las ratas SHR que habían recibido por vía intragástrica 1 mg/kg de Torasemida, que en las ratas SHR del grupo control negativo que habían recibido 1 ml de agua por esta misma vía. Además, la administración de 1 mg/kg de Torasemida aumentó significativamente la FENa, la FECl y la FEAU. Asimismo, esta administración aumentó ligeramente la FEK y la FECa, y produjo una ligera disminución de la FEP en las ratas SHR.

La administración de 10 mg/kg de Furosemida, que no había ocasionado ningún efecto sobre la PAS de las ratas SHR, incrementó sólo ligeramente la EVO de estos animales. Esta administración también ocasionó sólo ligeros aumentos de la FENa y la FECl en estas ratas. Por otra parte, la administración de 10 mg/kg de Furosemida disminuyó ligeramente la FEK y la FEP en las ratas SHR. En cualquier caso, las modificaciones causadas por este fármaco en todos estos valores nunca fueron significativas.

La EVO de las ratas tratadas con 50 mg/kg de Captopril fue muy similar a la EVO de las ratas del grupo control negativo, pero el grupo de ratas SHR tratadas con este fármaco presentó ligeros aumentos de la FENa y de la FECl. Sin embargo, la FEK, la FECa, la FEP y la FEAU disminuyeron ligeramente en las ratas SHR tratadas con 50 mg/kg de Captopril.

No se apreciaron diferencias significativas entre los valores del Acr y

de la FEU de las ratas SHR del grupo control negativo, y los valores correspondientes de las ratas de los restantes grupos.

Los resultados de este apartado se reflejan en las Figuras 32, 33, 34, 35 y 36, y en la Tabla 7.

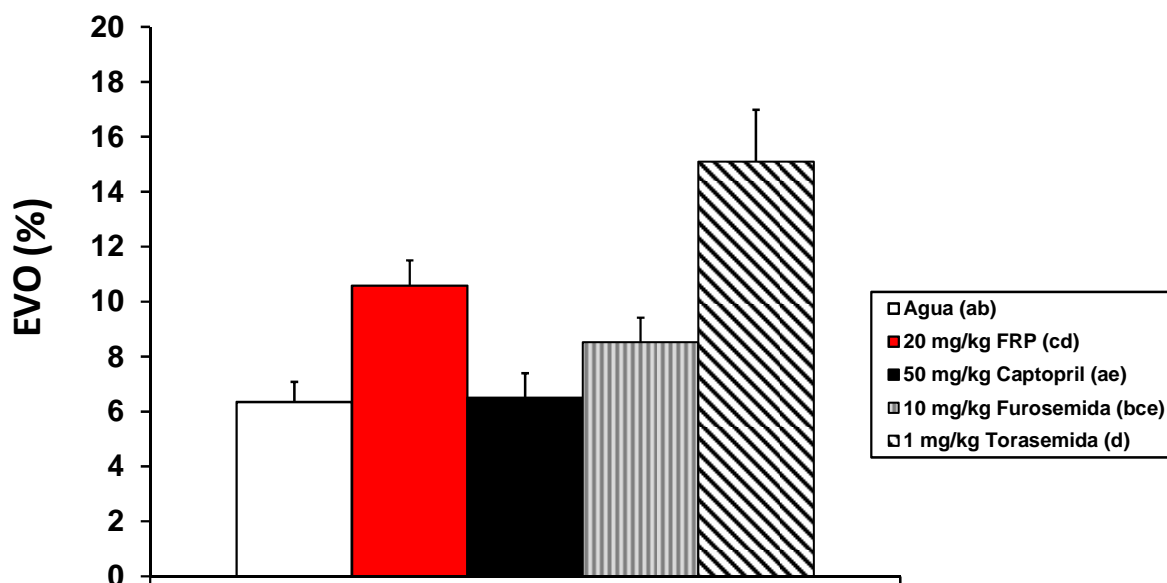


Figura 32. Excreción volumétrica de orina (EVO) en ratas espontáneamente hipertensas, 4 horas después de administrar diferentes compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▨) o 1 mg/kg de Torasemida (▩). Los datos expresan la media \pm EEM, para un mínimo de 8 ratas. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

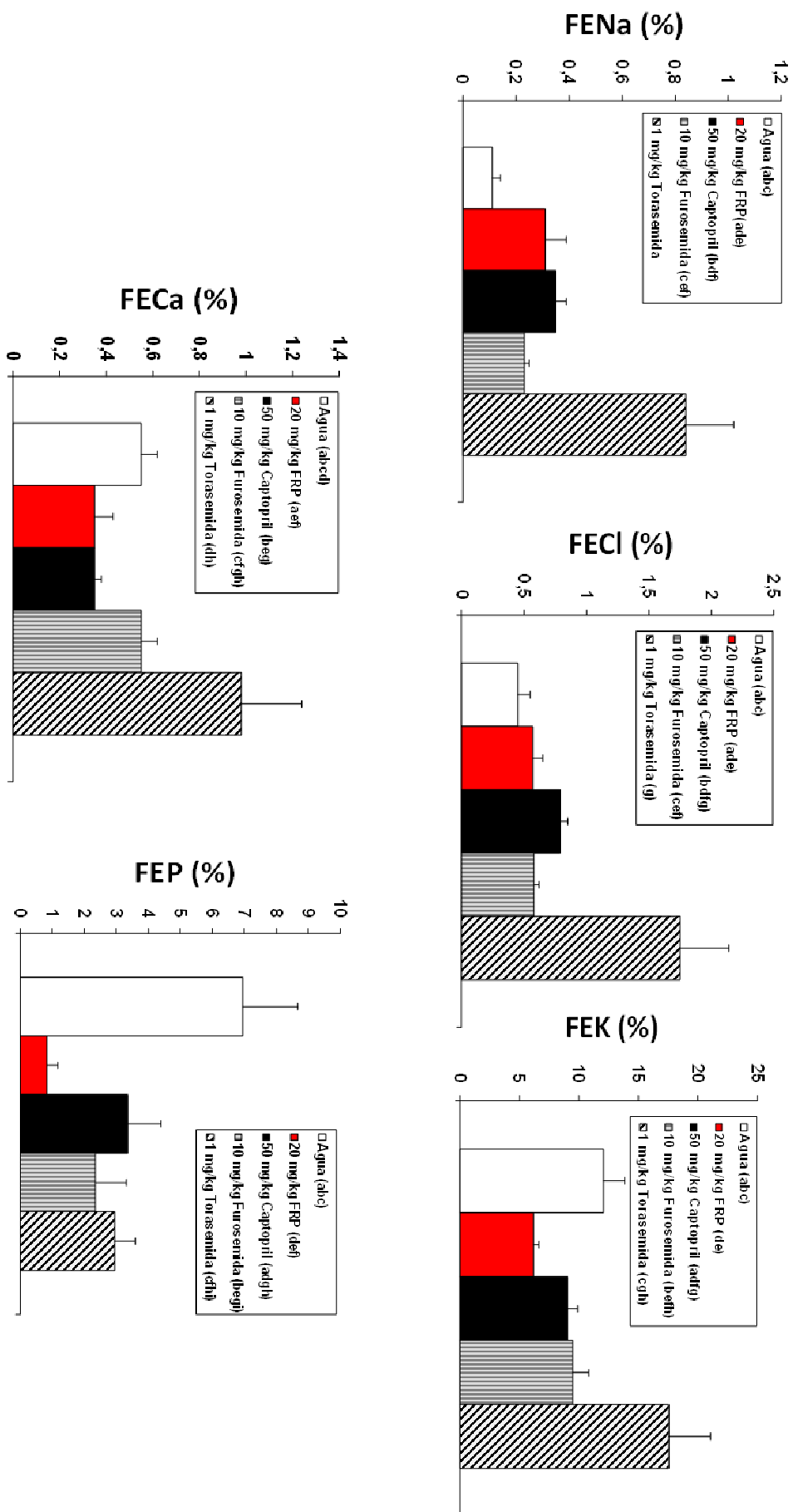


Figura 33. Fracción de excreción (FE) de sodio (FENa), cloro (FECl), potasio (FEK), calcio (FECa) y fósforo (FEP) en ratas espontáneamente hipertensas, después de administrar distintos compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▨) o 1 mg/kg de Torasemida (▩). Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de las administraciones. Los datos representan la media \pm EEM para un mínimo de 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

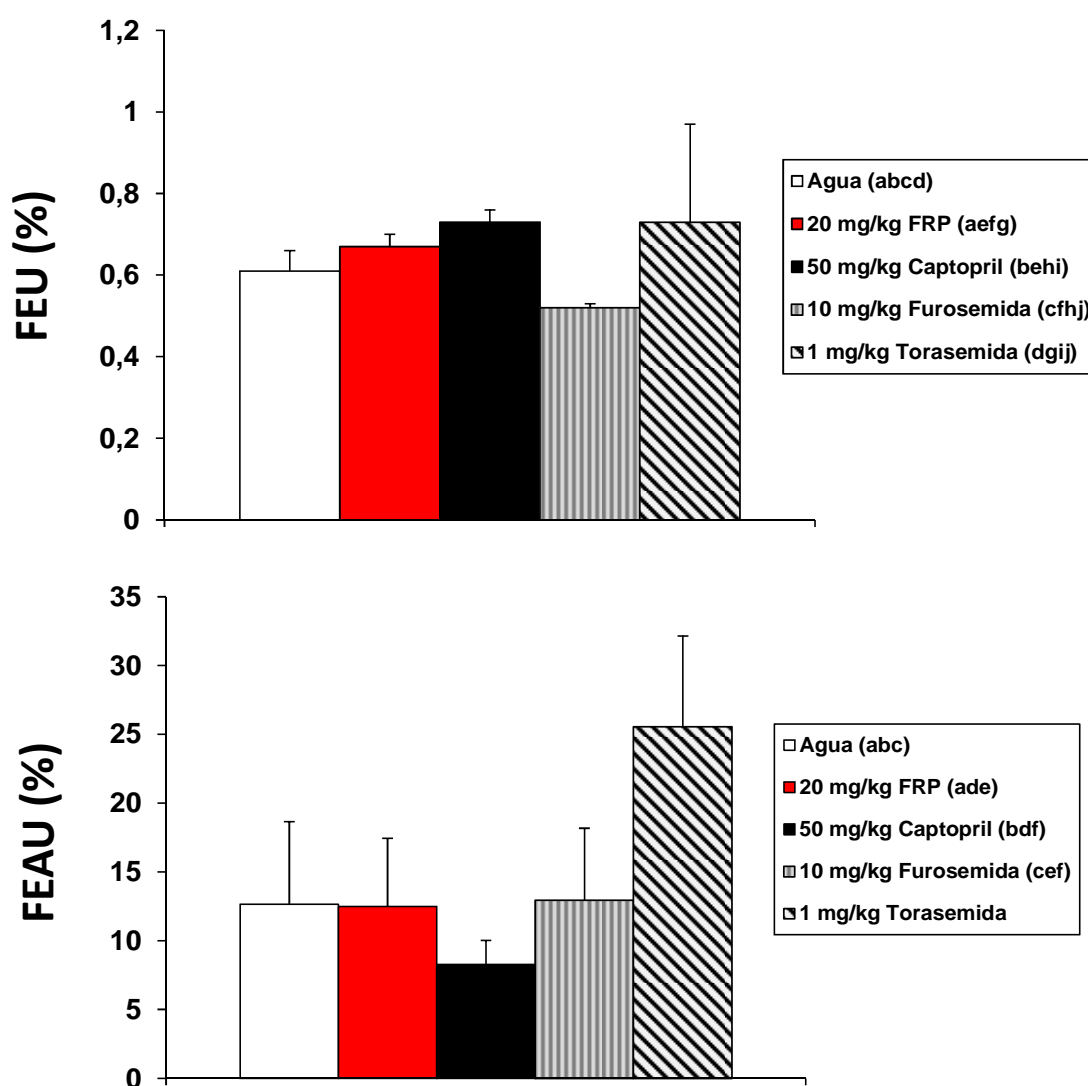


Figura 34. Fracción de excreción de urea (FEU) y de ácido úrico (FEAU) en ratas espontáneamente hipertensas tratadas, por vía intragástrica, respectivamente, con los siguientes compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▨) o 1 mg/kg de Torasemida (▩). Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de administrar a las ratas los compuestos citados anteriormente. Los datos expresan la media ± EEM, para un mínimo de 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

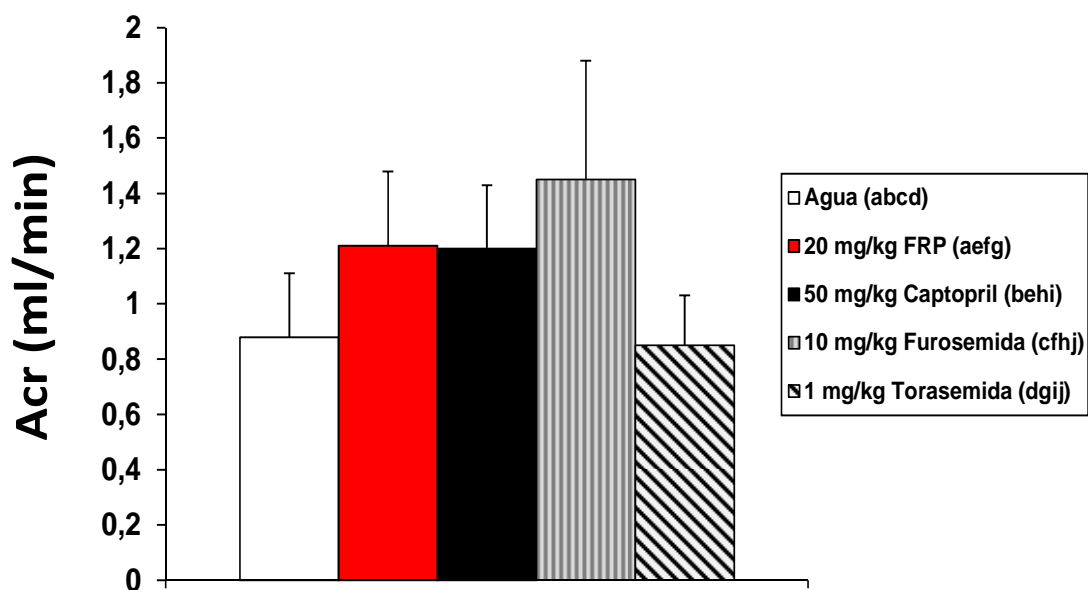


Figura 35. Aclaramiento de creatinina (Acr) en ratas espontáneamente hipertensas tratadas, por vía intragástrica, respectivamente, con los siguientes compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (▨) o 1 mg/kg de Torasemida (▩). Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de administrar a las ratas los compuestos citados anteriormente. Los datos expresan la media \pm EEM, para un mínimo de 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

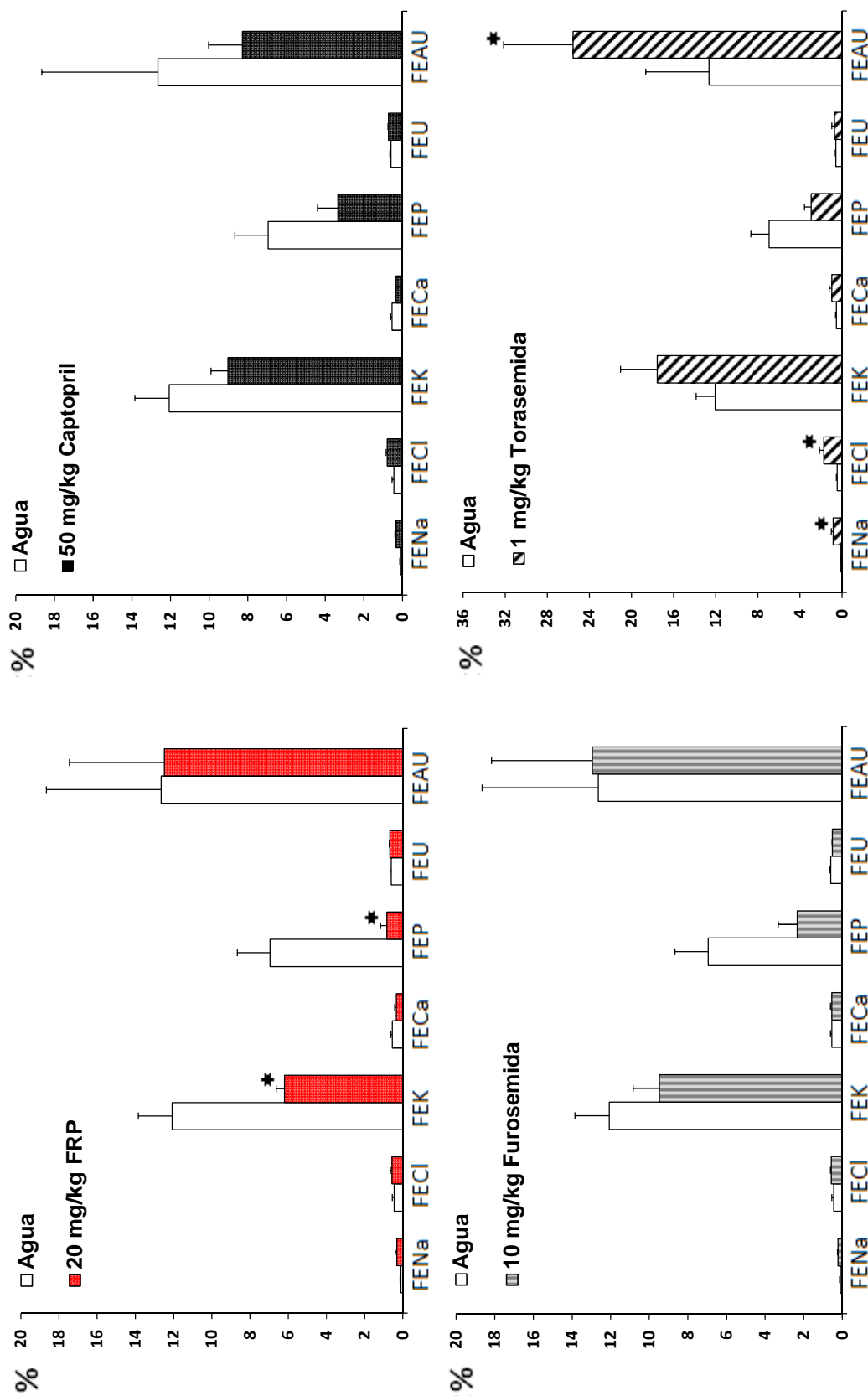


Figura 36. Fracción de excreción de sodio (FENa), cloro (FECl), potasio (FEK), calcio (FECa), fosfato (FEP), urea (FEU) y ácido úrico (FEAU), en ratas espontáneamente hipertensas, después de administrar a estos animales distintos compuestos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■), 50 mg/kg de Captopril (■), 10 mg/kg de Furosemida (■), 1 mg/kg de Torasemida (■). Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de las administraciones. Los datos representan la media \pm EEM, para un mínimo de 5 animales. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al grupo control negativo ($P < 0.05$). P se estimó utilizando un test de la T de Student para datos no apareados.

Tabla 7. Aclaramiento de creatinina (Acr) y fracción de excreción de sodio (FENa), cloro (FECl), potasio (FEK), calcio (FECa), fósforo (FEP), urea (FEU) y ácido úrico (FEAU) en ratas espontáneamente hipertensas, después de administrar distintos compuestos: agua, 20 mg/kg de FraxiPure (FRP), 50 mg/kg de Captopril, 10 mg/kg de Furosemida o 1 mg/kg de Torasemida. Las muestras de sangre y orina se obtuvieron 4 horas después de las administraciones. Los datos expresan la media \pm EEM, para un mínimo de 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

	Agua	FRP (20 mg/kg)	Captopril (50 mg/kg)	Furosemida (10 mg/kg)	Torasemida (1 mg/kg)
Ccr (ml/min)	0,88 \pm 0,23 (abcd)	1,21 \pm 0,27 (aefg)	1,20 \pm 0,23 (behi)	1,45 \pm 0,43 (cfhj)	0,85 \pm 0,18 (dgij)
FENa (%)	0,11 \pm 0,03 (abc)	0,31 \pm 0,08 (ade)	0,35 \pm 0,04 (bdf)	0,23 \pm 0,02 (cef)	0,84 \pm 0,18
FECl (%)	0,45 \pm 0,10 (abc)	0,57 \pm 0,08 (ade)	0,79 \pm 0,06 (bdfg)	0,58 \pm 0,04 (cef)	1,75 \pm 0,39 (g)
FEK (%)	12,07 \pm 1,78 (abc)	6,19 \pm 0,45 (de)	9,03 \pm 0,88 (adfg)	9,48 \pm 1,36 (befh)	17,56 \pm 3,49 (cgh)
FECa (%)	0,55 \pm 0,07 (abcd)	0,35 \pm 0,08 (aef)	0,35 \pm 0,03 (beg)	0,55 \pm 0,07 (cfgn)	0,98 \pm 0,26 (dh)
FEP (%)	6,95 \pm 1,72 (abc)	0,83 \pm 0,34 (def)	3,35 \pm 1,05 (adgh)	2,35 \pm 0,97 (begi)	2,95 \pm 0,64 (cfhi)
FEU (%)	0,61 \pm 0,05 (abcd)	0,67 \pm 0,03 (aefg)	0,73 \pm 0,03 (behj)	0,52 \pm 0,01 (cfhj)	0,73 \pm 0,24 (dgij)
FEAU (%)	12,65 \pm 6,01 (abc)	12,48 \pm 4,97 (ade)	8,29 \pm 1,74 (bdf)	12,96 \pm 5,22 (cef)	25,55 \pm 6,60

4.1.3. Efectos sobre el balance redox

Tal como se señaló el apartado 3.2.3. de Material y Métodos, la capacidad antioxidante del plasma y los niveles plasmáticos de MDA de las ratas SHR del grupo control negativo, se medían 4 horas después de haber administrado 1 ml de agua a estos animales. En el apartado 3.2.3. de Material y Métodos también mencionamos que la capacidad antioxidante del plasma y los niveles plasmáticos de MDA de las ratas SHR de los restantes grupos, se medían en el momento que esperábamos la máxima disminución de la PAS después de la correspondiente administración. Es decir, 4 horas después de administrar 20 mg/kg de FRP y 8 horas después de administrar 50 mg/kg de Captopril.

La capacidad antioxidante del plasma, capacidad para absorber radicales de oxígeno (ORAC), de las ratas SHR a las que habíamos administrado 50 mg/kg de Captopril mediante sonda intragástrica ($8,3 \pm 0,67$ μmol TROLOX/ml plasma) fue menor que la capacidad antioxidante del plasma de las ratas SHR a las habíamos administrado agua por el mismo procedimiento ($8,85 \pm 0,57$ μmol TROLOX/ml plasma). Pudimos comprobar que el plasma de los animales tratados de forma aguda con 20 mg/kg de FRP tenía mayor capacidad antioxidante ($10,59 \pm 0,58$ μmol TROLOX/ml plasma), que el plasma de las ratas de estos grupos (Figura 37).

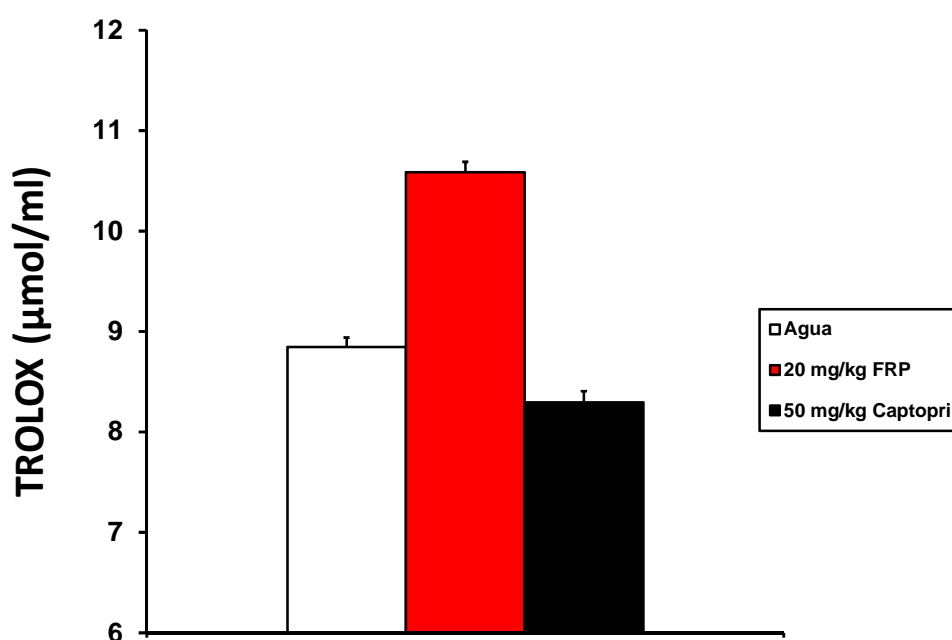


Figura 37. Capacidad antioxidante del plasma de ratas espontáneamente hipertensas, expresada como la equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma, después de la administración intragástrica de diferentes productos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■) o 50 mg/kg Captopril (■). Los datos representan valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se observaron diferencias significativas entre todos los grupos ($P < 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

Las ratas SHR a las que habíamos administrado 50 mg/kg de Captopril mediante sonda intragástrica tenían niveles plasmáticos de MDA ($0,6 \pm 0,02$ nmol MDA/ml plasma) semejantes a los de las ratas SHR tratadas por esta vía con 20 mg/kg de FRP ($0,58 \pm 0,02$ nmol MDA/ml plasma). Estos dos grupos de animales presentaban menores concentraciones plasmáticas de este metabolito que las ratas SHR del grupo control negativo, a las que habíamos administrado 1 ml de agua por vía intragástrica ($0,67 \pm 0,02$ nmol MDA/ml plasma) (Figura 38).

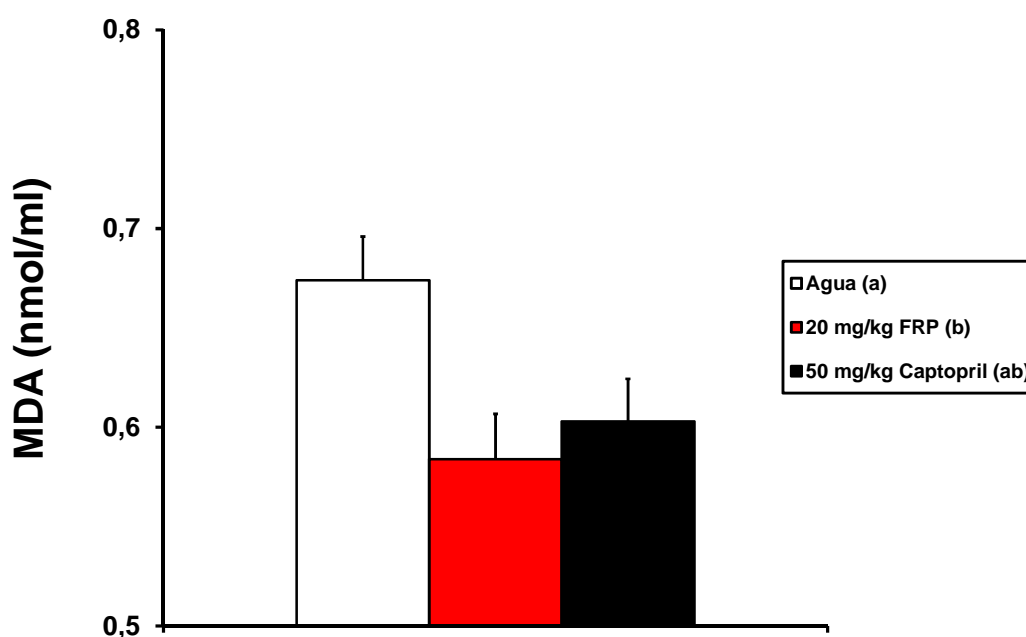


Figura 38. Concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) en ratas espontáneamente hipertensas, después de la administración intragástrica de diferentes productos: agua (□), 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) (■) o 50 mg/kg Captopril (■). Los datos representan valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

La Tabla 8 muestra los valores plasmáticos de ORAC y de MDA de ratas SHR a las que habíamos administrado por vía intragástrica agua, 20 mg/kg de FRP o 50 mg/kg de Captopril.

Tabla 8. Valores de la capacidad antioxidante del plasma, expresada como la equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma, y de la concentración plasmática de malondialdehído (MDA) de ratas espontáneamente hipertensas, después de administrar diferentes productos: agua, 20 mg/kg de FraxiPure (FRP) o 50 mg/kg Captopril. Los datos representan valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

	AGUA	FRP 20 mg/kg	CAPTOPRIL 50 mg/kg
TROLOX ($\mu\text{mol/ml}$)	8,85 \pm 0,57	10,59 \pm 0,58	8,3 \pm 0,67
MDA (nmol/ml)	0,67 \pm 0,02 (a)	0,58 \pm 0,02 (b)	0,6 \pm 0,02 (ab)

4.2. RESULTADOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS TRATADAS CRONICAMENTE CON FRAXIPURE

4.2.1. Efectos sobre la presión arterial

Las ratas SHR que ingerían diariamente agua o FRP, mostraron un incremento progresivo de la presión arterial desde que tenían 6 semanas de vida hasta que tenían aproximadamente 10 semanas de vida. A partir de este momento, la PAS de estos animales se mantuvo alta, pero permaneció bastante estable hasta la semana 20 de vida. El tratamiento con Captopril atenuó llamativamente el desarrollo de la hipertensión en las ratas SHR y las ratas tratadas con este fármaco siempre mostraron valores de PAS mucho más bajos que las restantes ratas. El tratamiento con FRP también atenuó el desarrollo de hipertensión en las ratas SHR, pero el efecto antihipertensivo fue mucho más acentuado en el grupo tratado con 50 mg/kg/día de Captopril, que en los grupos tratados con FRP. En estos últimos grupos, la disminución de la PAS se apreció especialmente durante el período de estabilización de la presión arterial. Es decir, la disminución de esta variable en las ratas tratadas con FRP se apreció sobre todo desde que estos animales tenían 11 semanas de vida. Desde este momento, las ratas tratadas con FRP siempre mostraron valores de PAS significativamente más bajos que las ratas del grupo control negativo. La disminución de la PAS fue además bastante similar en las ratas tratadas con 20 mg/kg/día de FRP y en las tratadas con 40 mg/kg/día del extracto. Sin embargo, la disminución de la PAS fue paradójicamente algo menor en las ratas tratadas con 60 mg/kg/día de FRP.

La PAS de las ratas que se habían tratado diariamente con FRP aumentó cuando se retiró el tratamiento con este extracto, y dos semanas después de suprimir los tratamientos con 20, 40 o 60 mg/kg/día de FRP, los animales de estos grupos tenían ya valores de PAS semejantes a los de las

ratas del grupo que había ingerido siempre agua. Sin embargo, cuando se retiró el tratamiento con 50 mg/kg/día de Captopril, la reversión del efecto antihipertensivo no fue total, y la PAS de las ratas que habían ingerido el fármaco hasta las 20 semanas de vida, se mantuvo siempre en niveles mucho más bajos que la PAS de las ratas que siempre habían ingerido agua. Pudimos de hecho apreciar diferencias significativas entre los valores de la PAS de estos dos grupos de ratas hasta el final del período experimental, momento en el que los animales tenían 24 semanas de vida.

La Figura 39 y la Tabla 9 reflejan los resultados descritos en este apartado. En la Figura 39 se indica la diferencia estadística entre la PAS de las ratas de los distintos grupos durante el período de tratamiento, considerado este período de forma global. Es decir, sin discriminar la fase inicial de incremento brusco de la PAS en las ratas, y la fase de estabilización de la PAS en estos animales. En esta figura también se indica la diferencia estadística entre la PAS de las ratas de los distintos grupos durante el período de retirada de los tratamientos.

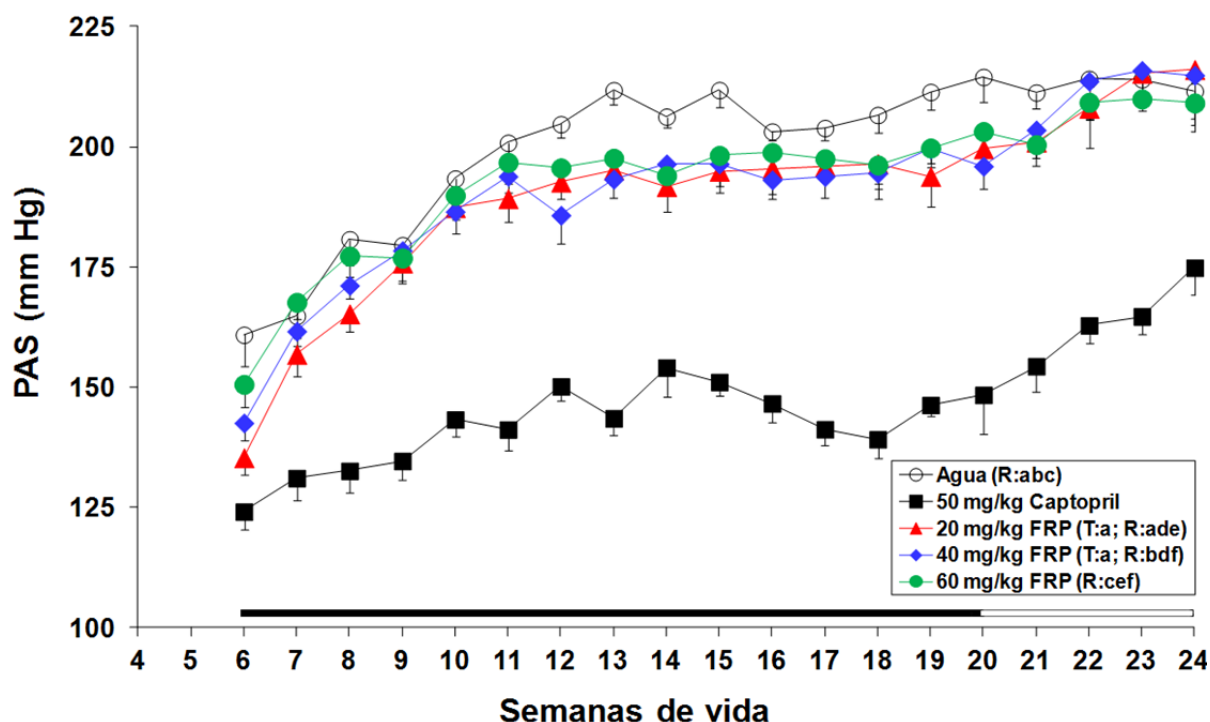


Figura 39. Presión arterial sistólica (PAS) de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento = T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (período de retirada del tratamiento = R, representado por la barra vacía) todas las ratas bebían agua. Los datos representan valores medios \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.

Tabla 9. Valores de presión arterial sistólica (PAS) (mm Hg) de ratas espontáneamente hipertensas tratadas diariamente con 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los tratamientos en los distintos grupos se mantuvieron hasta las 20 semanas de vida, y a partir de este momento todas las ratas ingerían agua. Los valores representan la media \pm EEM para 10 animales hasta las 20 semanas de vida, y para 5 animales desde las 21 hasta las 24 semanas de vida. Estos últimos valores corresponden a medidas obtenidas después de retirar los tratamientos.

Semanas de vida	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg/día	FRP		
			20 mg/kg/día	40 mg/kg/día	60 mg/kg/día
6	160,9 \pm 6,5	124,2 \pm 3,8	135,4 \pm 3,7	142,6 \pm 3,5	150,6 \pm 4,7
7	164,9 \pm 4,5	131,2 \pm 4,6	156,9 \pm 3,4	161,7 \pm 2,9	167,7 \pm 3,4
8	180,8 \pm 5,5	132,7 \pm 4,5	165,3 \pm 3,0	171,2 \pm 2,8	177,3 \pm 4,3
9	179,6 \pm 2,5	134,7 \pm 3,9	175,9 \pm 3,5	178,5 \pm 3,5	176,9 \pm 4,7
10	193,4 \pm 3,6	143,3 \pm 3,5	187,4 \pm 4,2	186,6 \pm 4,5	189,9 \pm 3,4
11	200,9 \pm 2,4	141,3 \pm 4,3	189,3 \pm 3,8	193,9 \pm 3,3	196,8 \pm 4,3
12	204,7 \pm 2,8	150,2 \pm 3,0	192,7 \pm 5,3	185,8 \pm 5,8	195,7 \pm 4,2
13	211,8 \pm 3,0	143,1 \pm 3,6	195,2 \pm 5,2	193,3 \pm 4,0	197,7 \pm 2,1
14	206,3 \pm 2,3	154,1 \pm 6,2	191,8 \pm 5,1	196,5 \pm 2,5	194,0 \pm 3,9
15	211,8 \pm 3,4	151,1 \pm 2,9	194,9 \pm 5,6	196,5 \pm 4,7	198,3 \pm 3,5
16	203,2 \pm 1,9	146,7 \pm 3,9	195,5 \pm 5,3	193,2 \pm 4,1	198,9 \pm 2,9
17	203,9 \pm 2,4	141,3 \pm 3,4	196,0 \pm 4,9	193,8 \pm 4,5	197,5 \pm 2,4
18	206,6 \pm 3,8	139,2 \pm 4,0	196,5 \pm 4,9	194,5 \pm 5,3	196,3 \pm 3,9
19	211,4 \pm 3,6	146,3 \pm 2,3	193,9 \pm 5,3	199,6 \pm 3,7	199,8 \pm 3,3
20	214,5 \pm 5,1	148,4 \pm 8,0	199,6 \pm 5,0	196,0 \pm 4,8	203,2 \pm 4,4
21	211,3 \pm 3,4	154,4 \pm 5,4	201,0 \pm 6,8	203,5 \pm 2,1	200,5 \pm 2,8
22	214,1 \pm 8,2	162,9 \pm 3,7	208,0 \pm 6,7	213,7 \pm 1,1	209,3 \pm 3,7
23	214,1 \pm 4,2	164,7 \pm 3,7	215,3 \pm 7,7	215,9 \pm 5,5	210,0 \pm 2,6
24	211,6 \pm 7,1	174,9 \pm 5,5	216,1 \pm 7,2	214,9 \pm 1,4	209,1 \pm 5,8

4.2.2. Efectos sobre el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida

El peso corporal de las ratas SHR de todos los grupos aumentó progresivamente desde el comienzo del estudio hasta que los animales tenían 20 semanas de vida.

El peso corporal de las ratas tratadas con 40 mg/kg/día o 60 mg/kg/día de FRP fue siempre algo mayor que el peso corporal de las ratas que ingerían agua. Este incremento de peso no se apreció en las ratas que se trataban con 20 mg/kg/día de FRP. Por otra parte, a partir del momento en el que se retiró el tratamiento con FRP, el peso de los animales que se habían tratado con el extracto fue siempre semejante al peso de los animales que ingerían agua.

Las ratas tratadas con 50 mg/kg/día de Captopril ganaron peso corporal de forma algo más lenta que las restantes ratas. La diferencia de peso entre las ratas tratadas con 50 mg/kg/día de Captopril y las ratas de los restantes grupos se apreció mejor cuando los animales tuvieron más edad, y esta diferencia se mantuvo hasta el final del período experimental. Es decir, la diferencia en el peso corporal de las ratas tratadas con 50 mg/kg/día de Captopril se mantuvo también después de haber retirado este tratamiento.

La Figura 40 y la Tabla 10 reflejan los resultados descritos en este apartado. En la Figura 40 se indica la diferencia estadística entre el peso corporal de las ratas de los distintos grupos durante el período de tratamiento. En esta figura también se indica la diferencia estadística entre el peso corporal de las ratas de los distintos grupos durante el período de retirada de los tratamientos.

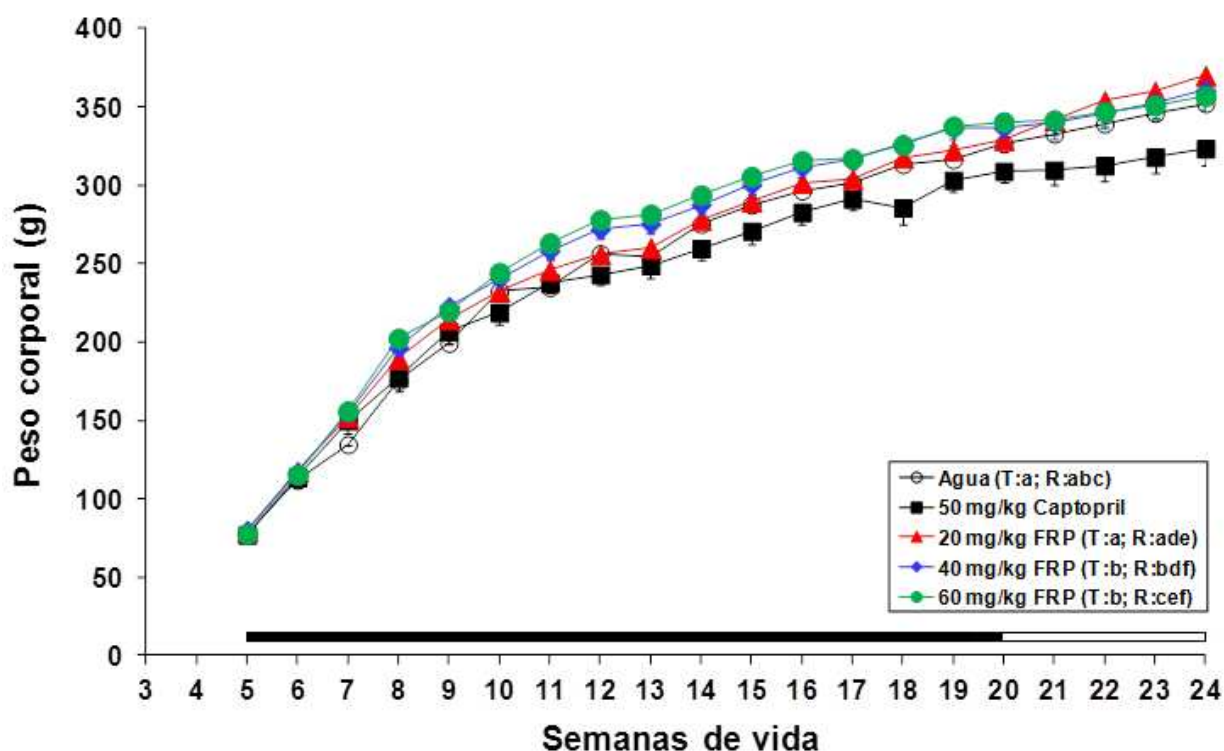


Figura 40. Peso corporal de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento = T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (período de retirada del tratamiento = R, representado por la barra vacía) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.

Tabla 10. Valores del peso corporal en gramos (g) de ratas espontáneamente hipertensas en distintos momentos durante la administración diaria de agua, 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para 10 animales hasta las 20 semanas de vida y para 5 animales desde las 21 hasta las 24 semanas de vida. Estos últimos valores corresponden a medidas obtenidas después de retirar los tratamientos.

Semanas de vida	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg/día	FRP		
			20 mg/kg/día	40 mg/kg/día	60 mg/kg/día
5	77,6 \pm 2,9	76,92 \pm 5,1	79,2 \pm 3,7	79,9 \pm 4,7	77,7 \pm 5,4
6	111,9 \pm 4,0	113,7 \pm 6,3	117,5 \pm 3,4	117,0 \pm 5,0	115,4 \pm 6,7
7	134,7 \pm 4,5	149,8 \pm 8,3	156,8 \pm 3,0	155,1 \pm 5,5	156,0 \pm 8,7
8	175,4 \pm 7,1	177,1 \pm 8,2	192,9 \pm 3,5	196,5 \pm 5,4	202,3 \pm 7,4
9	199,3 \pm 8,5	206,4 \pm 7,7	214,6 \pm 4,2	222,7 \pm 4,5	219,7 \pm 11,7
10	232,5 \pm 8,1	218,9 \pm 7,5	232,4 \pm 3,8	240,6 \pm 4,1	244,3 \pm 10,9
11	234,9 \pm 10,2	237,6 \pm 6,6	245,8 \pm 5,3	258,2 \pm 4,7	263,2 \pm 11,1
12	256,4 \pm 9,1	242,9 \pm 6,6	256,0 \pm 5,2	271,9 \pm 5,8	278,0 \pm 11,3
13	254,3 \pm 9,7	248,8 \pm 7,8	260,1 \pm 5,1	275,3 \pm 6,5	281,5 \pm 11,8
14	275,3 \pm 9,6	259,7 \pm 7,4	278,0 \pm 5,6	287,6 \pm 6,1	293,8 \pm 11,1
15	287,5 \pm 10,0	270,8 \pm 8,3	289,8 \pm 5,3	300,3 \pm 5,8	305,6 \pm 11,8
16	296,6 \pm 10,2	282,8 \pm 8,0	301,6 \pm 4,9	311,4 \pm 5,9	315,7 \pm 12,0
17	301,1 \pm 9,8	291,3 \pm 7,4	304,0 \pm 4,9	316,6 \pm 6,5	317,0 \pm 12,4
18	313,3 \pm 10,4	285,6 \pm 10,4	317,8 \pm 5,3	326,4 \pm 6,0	325,8 \pm 12,3
19	316,4 \pm 10,2	303,2 \pm 7,5	325,3 \pm 5,0	336,5 \pm 7,1	337,6 \pm 12,1
20	319,6 \pm 10,7	309,0 \pm 6,8	339,8 \pm 6,8	336,4 \pm 8,9	340,4 \pm 9,3
21	332,8 \pm 20,1	309,8 \pm 10,0	341,8 \pm 6,7	339,8 \pm 9,9	341,6 \pm 9,4
22	339,2 \pm 20,9	312,6 \pm 9,8	354,0 \pm 7,7	346,0 \pm 10,0	346,8 \pm 8,9
23	346,0 \pm 20,0	318,0 \pm 10,6	360,0 \pm 7,2	353,0 \pm 10,5	351,0 \pm 8,3
24	352,2 \pm 19,8	303,0 \pm 10,6	370,0 \pm 8,2	360,6 \pm 11,4	357,0 \pm 8,8

El consumo de dieta sólida aumentó en todas las ratas SHR al principio del período experimental, y se estabilizó cuando los animales tenían aproximadamente 10 semanas de vida, resultando bastante estable en todos los grupos a partir de este momento. No se apreciaron diferencias entre la ingesta sólida de las ratas tratadas con 20 mg/kg/día de FRP, y la ingesta sólida de las ratas del grupo control negativo. La ingesta sólida de las ratas tratadas con 50 mg/kg/día de Captopril fue también similar a la ingesta sólida de las ratas del grupo control negativo. Sin embargo, la ingesta sólida de las ratas tratadas con 40 mg/kg/día o 60 mg/kg/día de FRP fue algo mayor que la ingesta sólida de las ratas de los grupos anteriores. De hecho, se apreciaron diferencias significativas entre estos consumos a lo largo de todo el período de tratamiento.

La Figura 41 y la Tabla 11 reflejan los resultados descritos en este apartado. Los valores de ingesta sólida en cada animal son valores estimados a partir de la ingesta sólida del conjunto de animales de cada jaula. En la Figura 41 se indica la diferencia estadística entre la ingesta sólida de las ratas de los distintos grupos durante el período de tratamiento. No se realizaron comparaciones estadísticas durante el período de retirada de los tratamientos porque los valores de ingesta sólida en este período se estimaron a partir de una única jaula.

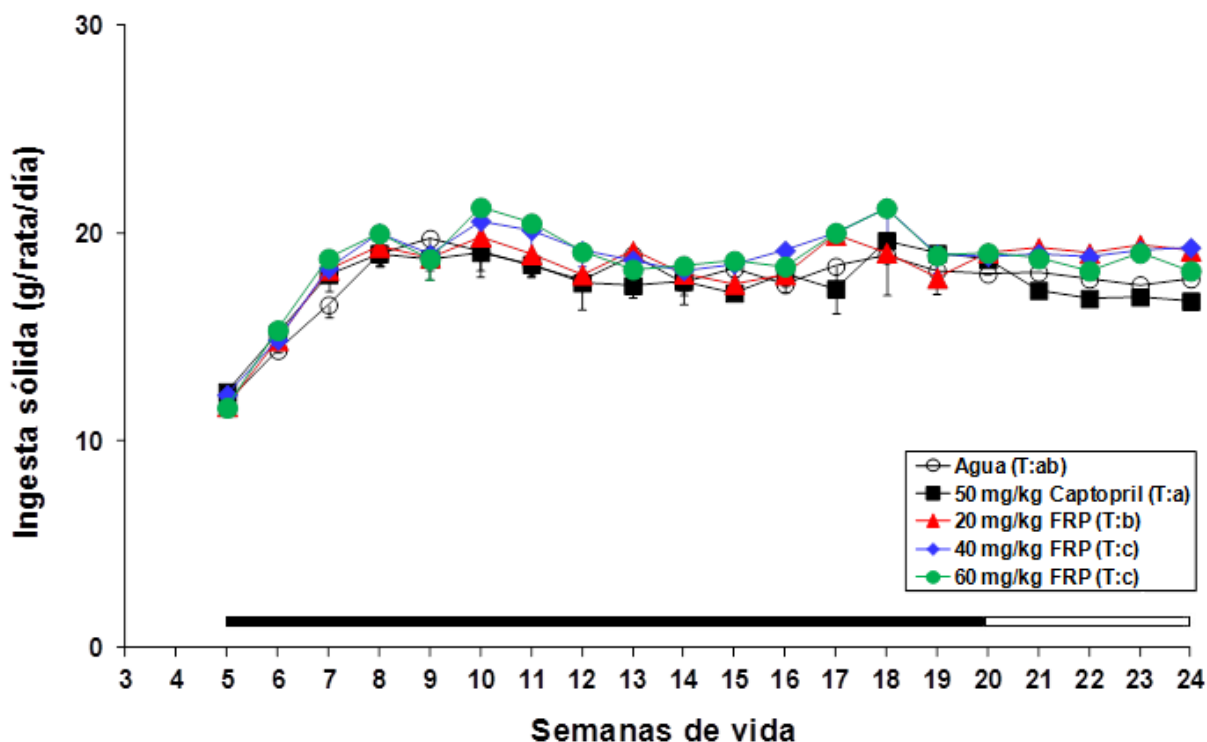


Figura 41. Ingesta sólida de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento = T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida (período de retirada del tratamiento = R, representado por la barra vacía) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.

Tabla 11. Valores semanales de ingesta sólida (g/rata/día) de ratas espontáneamente hipertensas, a las que se administraba diariamente agua, 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para 10 animales hasta las 20 semanas de vida y para 5 animales desde las 21 hasta las 24 semanas de vida. Estos últimos valores corresponden a medidas obtenidas después de retirar los tratamientos.

Semanas de vida	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg/día	FRP		
			20 mg/kg/día	40 mg/kg/día	60 mg/kg/día
5	11,9 \pm 0,4	12,4 \pm 0,7	11,7 \pm 0,2	12,2 \pm 0,0	11,6 \pm 0,2
6	14,3 \pm 0,1	15,2 \pm 0,6	14,8 \pm 0,2	14,9 \pm 0,0	15,3 \pm 0,1
7	16,5 \pm 0,6	18,0 \pm 0,8	18,2 \pm 0,4	18,3 \pm 0,1	18,8 \pm 0,5
8	19,0 \pm 0,5	19,0 \pm 0,6	19,3 \pm 0,	20,0 \pm 0,6	20,0 \pm 0,1
9	19,7 \pm 0,5	18,7 \pm 0,5	18,8 \pm 1,1	19,0 \pm 0,2	18,7 \pm 1,0
10	19,1 \pm 1,2	19,1 \pm 0,9	19,8 \pm 0,9	20,6 \pm 0,8	21,2 \pm 0,0
11	18,4 \pm 0,5	18,5 \pm 0,6	19,0 \pm 0,4	20,1 \pm 1,2	20,5 \pm 0,2
12	17,7 \pm 0,3	17,6 \pm 1,2	18,0 \pm 0,3	19,1 \pm 0,7	19,1 \pm 0,3
13	18,9 \pm 1,5	17,5 \pm 0,6	19,1 \pm 0,5	18,7 \pm 0,5	18,2 \pm 0,7
14	17,6 \pm 0,6	17,7 \pm 1,1	18,0 \pm 0,3	18,2 \pm 0,8	18,4 \pm 0,2
15	18,3 \pm 0,5	17,1 \pm 0,0	17,5 \pm 0,5	18,5 \pm 0,6	18,7 \pm 0,3
16	17,5 \pm 0,1	18,1 \pm 1,0	18,0 \pm 0,5	19,2 \pm 1,2	18,4 \pm 0,7
17	18,4 \pm 0,8	17,3 \pm 1,2	19,9 \pm 0,1	20,0 \pm 0,0	20,0 \pm 0,0
18	18,9 \pm 0,2	19,6 \pm 0,4	19,1 \pm 2,1	21,2 \pm 2,4	21,2 \pm 0,2
19	18,2 \pm 0,5	19,0 \pm 1,1	17,8 \pm 0,7	19,0 \pm 0,9	18,9 \pm 0,4
20	18,0 \pm 0,0	18,7 \pm 0,0	19,1 \pm 0,0	18,9 \pm 0,0	19,0 \pm 0,0
21	18,1	17,2	19,3	19,0	18,8
22	17,8	16,8	19,0	18,9	18,2
23	17,5	16,9	19,4	19,1	19,0
24	17,8	16,7	19,2	19,3	18,2

La ingesta líquida aumentó en todas las ratas SHR al principio del período experimental, pero fue muy variable en todas ellas a lo largo del mismo. No obstante, pudimos apreciar un claro aumento de la ingesta líquida en las ratas tratadas diariamente con 50 mg/kg de Captopril, y apreciamos, por el contrario, una disminución de esta ingesta en todas las ratas que se trataban con FRP.

Cabe además resaltar que las ratas que se habían tratado con 50 mg/kg Captopril fueron las que presentaron menor ingesta líquida durante el período de retirada del tratamiento.

La Figura 42 y la Tabla 12 reflejan los resultados descritos en este apartado. Los valores de ingesta líquida en cada animal son valores estimados a partir de la ingesta líquida del conjunto de animales de cada jaula. En la Figura 42 se indica la diferencia estadística entre la ingesta líquida de las ratas de los distintos grupos, durante el período de tratamiento. No se realizaron comparaciones estadísticas durante el período de retirada de los tratamientos porque los valores de ingesta líquida en este período se estimaron a partir de una única jaula.

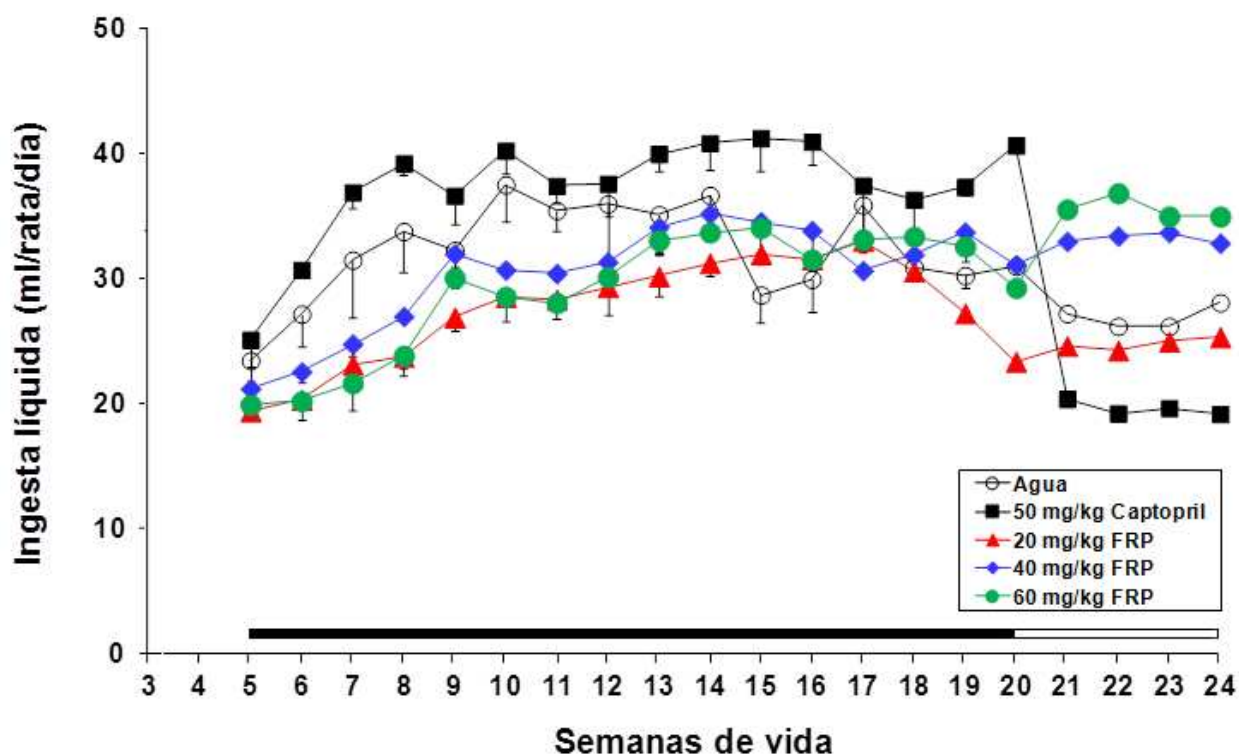


Figura 42. Ingesta líquida de ratas espontáneamente hipertensas. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento = T, representado por la barra sólida) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (○), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde la semana 20 hasta la semana 24 de vida todas (período de retirada del tratamiento = R, representado por la barra vacía) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni.

Tabla 12. Valores semanales de ingesta líquida (ml/rata/día) de ratas espontáneamente hipertensas, a las que se administraba diariamente agua, 50 mg/kg de Captopril o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para 10 animales hasta las 20 semanas de vida y para 5 animales desde las 21 hasta las 24 semanas de vida. Estos últimos valores corresponden a medidas obtenidas después de retirar los tratamientos.

Semanas de vida	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg/día	FRP		
			20 mg/kg/día	40 mg/kg/día	60 mg/kg/día
5	22,0 \pm 3,1	23,9 \pm 3,4	19,4 \pm 0,6	21,2 \pm 0,9	19,9 \pm 0,8
6	25,0 \pm 4,9	31,9 \pm 0,3	20,4 \pm 0,6	22,6 \pm 0,9	20,2 \pm 1,5
7	29,2 \pm 8,5	40,4 \pm 1,6	23,1 \pm 1,0	24,8 \pm 0,9	21,6 \pm 2,2
8	31,6 \pm 6,1	41,5 \pm 1,4	23,8 \pm 0,9	27,0 \pm 0,3	23,9 \pm 1,6
9	29,1 \pm 4,1	37,5 \pm 3,6	26,9 \pm 1,1	32,0 \pm 1,0	30,1 \pm 0,8
10	40,0 \pm 5,9	43,3 \pm 3,0	28,6 \pm 2,0	30,7 \pm 0,0	28,6 \pm 0,0
11	36,8 \pm 3,2	39,7 \pm 2,0	28,4 \pm 1,5	30,4 \pm 0,4	28,1 \pm 0,5
12	38,3 \pm 8,6	39,7 \pm 4,0	29,4 \pm 2,2	31,4 \pm 1,5	30,1 \pm 0,3
13	37,8 \pm 6,4	42,7 \pm 1,4	30,2 \pm 1,6	34,1 \pm 2,0	33,1 \pm 1,1
14	41,5 \pm 6,5	46,1 \pm 2,3	31,3 \pm 1,0	35,2 \pm 1,8	33,7 \pm 0,0
15	26,1 \pm 3,3	47,7 \pm 4,3	32,0 \pm 0,9	34,6 \pm 2,4	34,1 \pm 0,1
16	29,2 \pm 4,3	47,9 \pm 2,3	31,6 \pm 0,9	33,9 \pm 2,5	31,6 \pm 0,8
17	38,7 \pm 7,4	41,3 \pm 9,6	33,1 \pm 0,6	30,7 \pm 0,0	33,2 \pm 0,2
18	30,1 \pm 0,2	39,3 \pm 3,8	30,6 \pm 0,4	31,9 \pm 0,3	33,4 \pm 1,9
19	30,3 \pm 0,2	43,9 \pm 0,4	27,3 \pm 0,3	33,8 \pm 1,4	32,6 \pm 1,3
20	30,7 \pm 0,0	49,3 \pm 0,0	23,4 \pm 0,0	31,1 \pm 0,0	29,3 \pm 0,0
21	24,1	22,6	24,6	33,0	35,6
22	23,1	19,6	24,3	33,4	36,9
23	23,1	20,3	25,0	33,7	35,0
24	25,9	20,1	25,4	32,9	35,0

4.2.3. Efectos sobre el balance redox

Los valores plasmáticos de ORAC de las ratas de 20 semanas de vida que se habían tratado con 20 mg/kg/día o con 40 mg/kg/día de FRP, fueron significativamente más altos que los valores correspondientes en las ratas del grupo control negativo que habían ingerido agua. No se apreciaron diferencias significativas entre los valores plasmáticos de ORAC de las ratas del grupo tratado con 60 mg/kg/día de FRP, y los valores plasmáticos de ORAC de las ratas del grupo control negativo. Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre los valores plasmáticos de ORAC de las ratas del grupo tratado con 50 mg/kg/día de Captopril, y los valores plasmáticos de ORAC de las ratas del grupo control negativo. Por otra parte, cuando finalizó el período de retirada del tratamiento, momento en el que las ratas tenían 24 semanas de vida, no se observaron diferencias significativas entre los valores plasmáticos de ORAC de las ratas de los distintos grupos.

La Figura 43 y las Tablas 13 y 14 reflejan los resultados descritos en este apartado.

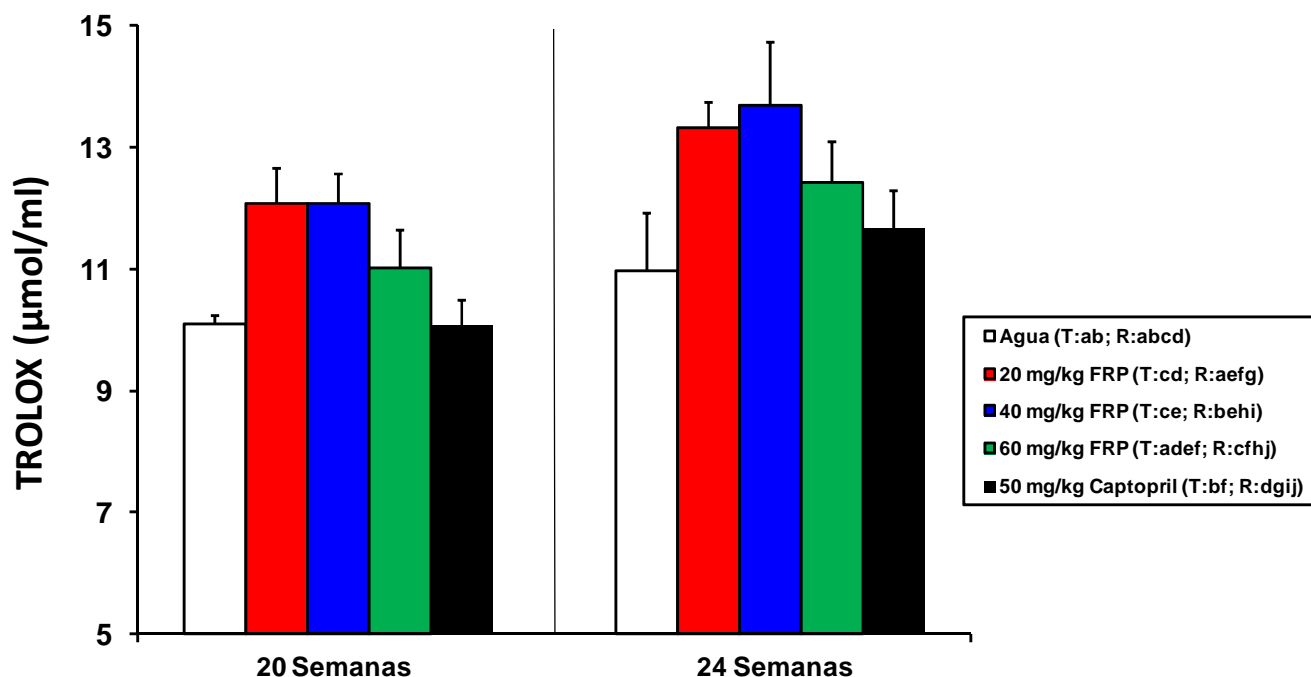


Figura 43. Capacidad antioxidante del plasma de ratas espontáneamente hipertensas con 20 y 24 semanas de vida, expresada como la equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (\square), 50 mg/kg de Captopril (\blacksquare) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg ($\color{red}\blacksquare$), 40 mg/kg ($\color{blue}\blacksquare$) y 60 mg/kg ($\color{green}\blacksquare$). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

Al finalizar el período de tratamiento (cuando los animales tenían 20 semanas de vida), las ratas que se habían tratado con FRP, y también las que se habían tratado con 50 mg/kg/día de Captopril, tenían menores concentraciones plasmáticas de MDA, que las ratas del grupo control negativo que habían ingerido agua.

Al finalizar el período de retirada del tratamiento, las ratas que habían ingerido 20 mg/kg/día de FRP mantenían concentraciones plasmáticas de MDA menores que las concentraciones correspondientes en las ratas del grupo control negativo. Las ratas tratadas con 40 mg/kg/día de FRP, 60 mg/kg/día de FRP o 50 mg/kg/día de Captopril, que tenían concentraciones plasmáticas de MDA menores que las de las ratas del grupo control negativo, presentaron un aumento de la concentración plasmática de este metabolito cuando se les retiró el correspondiente tratamiento. De hecho, 4 semanas después de retirar estos tratamientos, no apreciamos diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de MDA de los animales de estos grupos y los niveles plasmáticos de MDA de los animales del grupo control negativo.

La Figura 44 y las Tablas 13 y 14 reflejan los resultados descritos en este apartado.

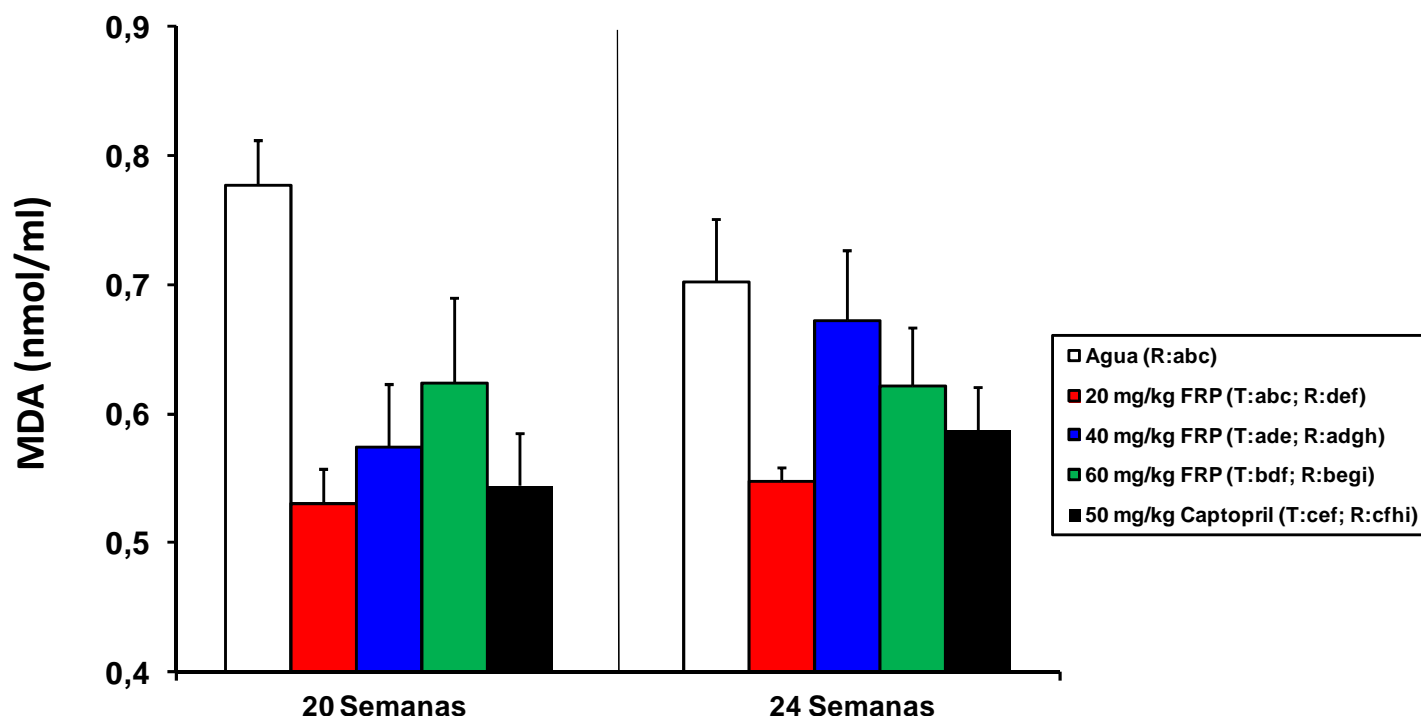


Figura 44. Concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) de ratas espontáneamente hipertensas con 20 y 24 semanas de vida. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (■), 40 mg/kg (■) y 60 mg/kg (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

Todos los tratamientos utilizados disminuyeron la concentración hepática de MDA de las ratas SHR de nuestro estudio. Por lo tanto, cuando los animales tenían 20 semanas de vida, todas las ratas tratadas tenían niveles más bajos de éste metabolito en el tejido hepático que las ratas del grupo control negativo. Al finalizar el período de retirada del tratamiento (cuando las ratas tenían 24 semanas de vida), no se apreciaron diferencias significativas entre la concentración hepática de MDA de los animales de los distintos grupos.

La Figura 45 y las Tablas 13 y 14 reflejan los resultados descritos en este apartado.

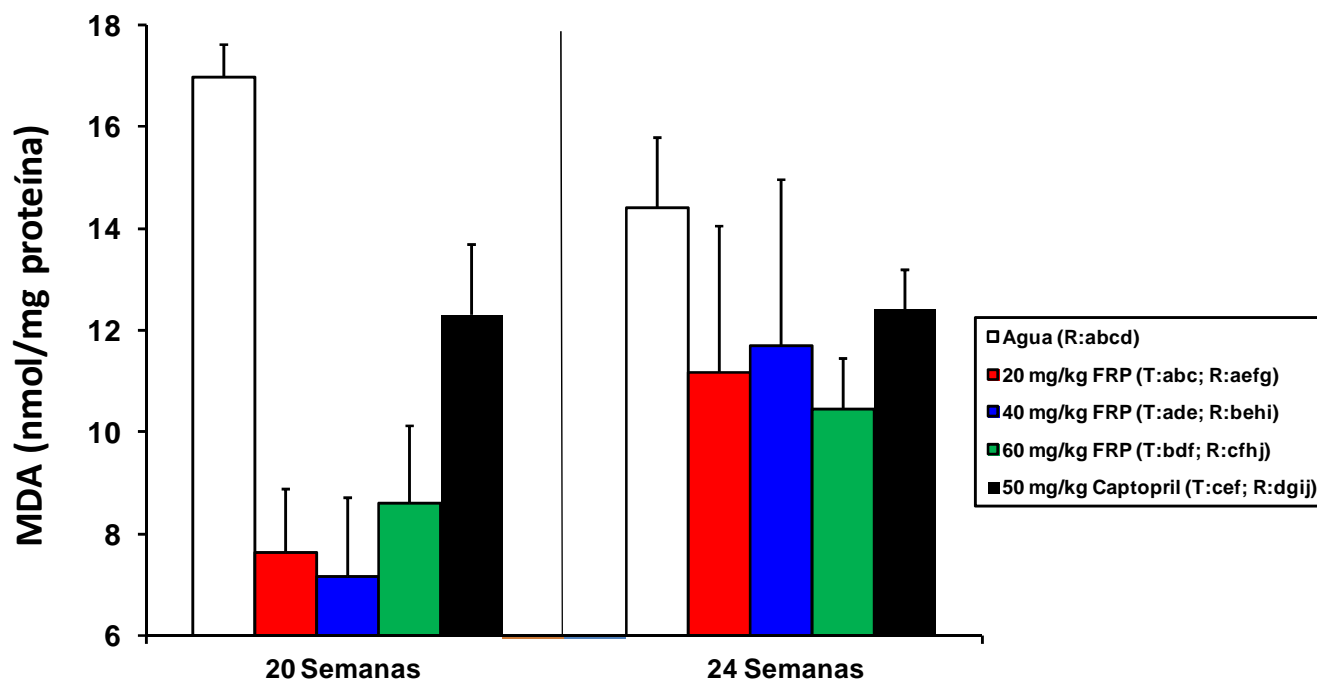


Figura 45. Concentración de malonildialdehído (MDA) en tejido hepático de ratas espontáneamente hipertensas con 20 y 24 semanas de vida. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (■), 40 mg/kg (■) y 60 mg/kg (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

Al finalizar el período de tratamiento, las ratas que se habían tratado con FRP, y también las que se habían tratado con 50 mg/kg/día de Captopril, tenían concentraciones hepáticas de GSH semejantes a las de las ratas del grupo control negativo que habían ingerido agua. Cabe sin embargo mencionar que se apreció un incremento no significativo de la concentración hepática de GSH en las ratas tratadas con 20 mg/kg/día de FRP, 40 mg/kg/día de FRP o 50 mg/kg/día de Captopril. Sin embargo, los valores de la concentración hepática de GSH en las ratas del grupo que se había tratado con 60 mg/kg/día de FRP, fueron algo menores que los valores correspondientes en las ratas del grupo control negativo.

Al finalizar el período de retirada del tratamiento, momento en el que las ratas tenían 24 semanas de vida, no se observaron diferencias significativas entre la concentración hepática de GSH de las ratas de los distintos grupos. En este momento, la concentración hepática de GSH de las ratas que se habían tratado con 60 mg/kg/día de FRP, fue desde luego muy semejante a la concentración hepática de GSH de las ratas del grupo control negativo que habían ingerido siempre agua.

La Figura 46 y las Tablas 13 y 14 reflejan los resultados descritos en este apartado.

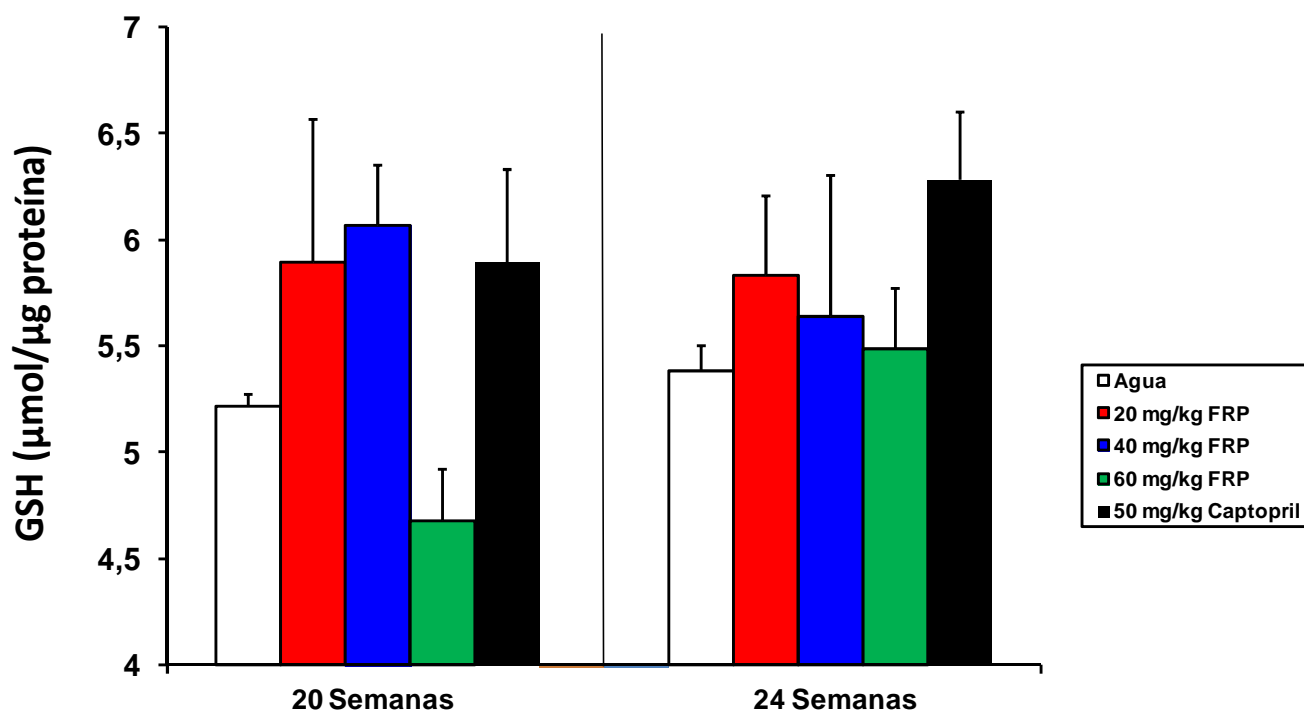


Figura 46. Concentración de glutatión reducido (GSH) en tejido hepático de ratas espontáneamente hipertensas con 20 y 24 semanas de vida. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (□), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (■), 40 mg/kg (■) y 60 mg/kg (■). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

Tabla 13. Capacidad antioxidante del plasma, medida como capacidad de este fluido biológico para absorber radicales libres de oxígeno y expresada como la equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma, concentración plasmática y hepática de malonidialdehído (MDA), y concentración hepática de glutatión reducido (GSH), de ratas espontáneamente hipertensas con 20 semanas de vida. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento) las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg/día	FRP 20 mg/kg/día	FRP 40 mg/kg/día	FRP 60 mg/kg/día
TROLOX ($\mu\text{mol/ml}$)	8,76 \pm 1,34 (ab)	10,07 \pm 0,42 (cd)	12,38 \pm 0,56 (ce)	12,08 \pm 0,48 (ade \dagger)	11,02 \pm 0,62 (b \dagger)
MDA (nmol/ml)	0,72 \pm 0,06	0,63 \pm 0,09 (abc)	0,53 \pm 0,03 (ade)	0,57 \pm 0,05 (bd \dagger)	0,62 \pm 0,07 (ce \dagger)
MDA (nmol/mg proteína)	16,98 \pm 0,62	11,96 \pm 2,72 (abc)	7,65 \pm 1,23 (ade)	10,66 \pm 2,03 (bd \dagger)	9,67 \pm 1,25 (ce \dagger)
GSH ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteína)	5,22 \pm 0,05	5,89 \pm 0,44	5,90 \pm 0,67	6,07 \pm 0,28	4,68 \pm 0,24

Tabla 14. Capacidad antioxidante del plasma, medida como capacidad de este fluido biológico para absorber radicales libras de oxígeno y expresada como la equivalencia en μmol de TROLOX/ml plasma, concentración plasmática y hepática de malonildialdehído (MDA), y concentración hepática de glutatión reducido (GSH) de ratas espontáneamente hipertensas con 24 semanas de vida. Durante el período comprendido entre la semana 5 y la semana 20 de vida, las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Sin embargo, a partir de la semana 20 de vida, todas las ratas ingerían agua. Los valores representan la media \pm EEM para 5 animales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg/día	FRP 20 mg/kg/día	FRP 40 mg/kg/día	FRP 80 mg/kg/día
TROLOX ($\mu\text{mol/ml}$)	10,97 \pm 0,95 (abcd)	11,67 \pm 0,62 (aefg)	13,32 \pm 0,40 (behj)	13,69 \pm 1,04 (cfhj)	12,42 \pm 0,68 (dgij)
MDA (nmol/ml)	0,70 \pm 0,05 (abc)	0,59 \pm 0,03 (def)	0,63 \pm 0,08 (adgh)	0,67 \pm 0,05 (begi)	0,62 \pm 0,04 (cfhi)
MDA (nmol/mg proteína)	14,40 \pm 1,40 (abcd)	12,65 \pm 2,18 (aefg)	11,87 \pm 3,63 (behj)	12,19 \pm 3,61 (cfhj)	12,63 \pm 2,30 (dgij)
GSH ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteína)	5,38 \pm 0,12	6,28 \pm 0,32	5,83 \pm 0,37	5,64 \pm 0,67	5,49 \pm 0,28

4.2.4. Efecto sobre la relajación vascular endotelio dependiente de acetilcolina

La relajación provocada por acetilcolina en las aortas de los animales tratados con FRP fue siempre mayor que la relajación provocada por este agente en las aortas de los animales que habían ingerido agua. Este incremento en la respuesta de acetilcolina también se apreció en las aortas de las ratas 4 semanas después de haber retirado el tratamiento con el extracto.

Los valores del porcentaje de relajación producido por acetilcolina en las distintas preparaciones de anillos de aorta de ratas SHR, que corresponden a los resultados anteriores, se reflejan en la Figura 47 y en las Tablas 15 y 16.

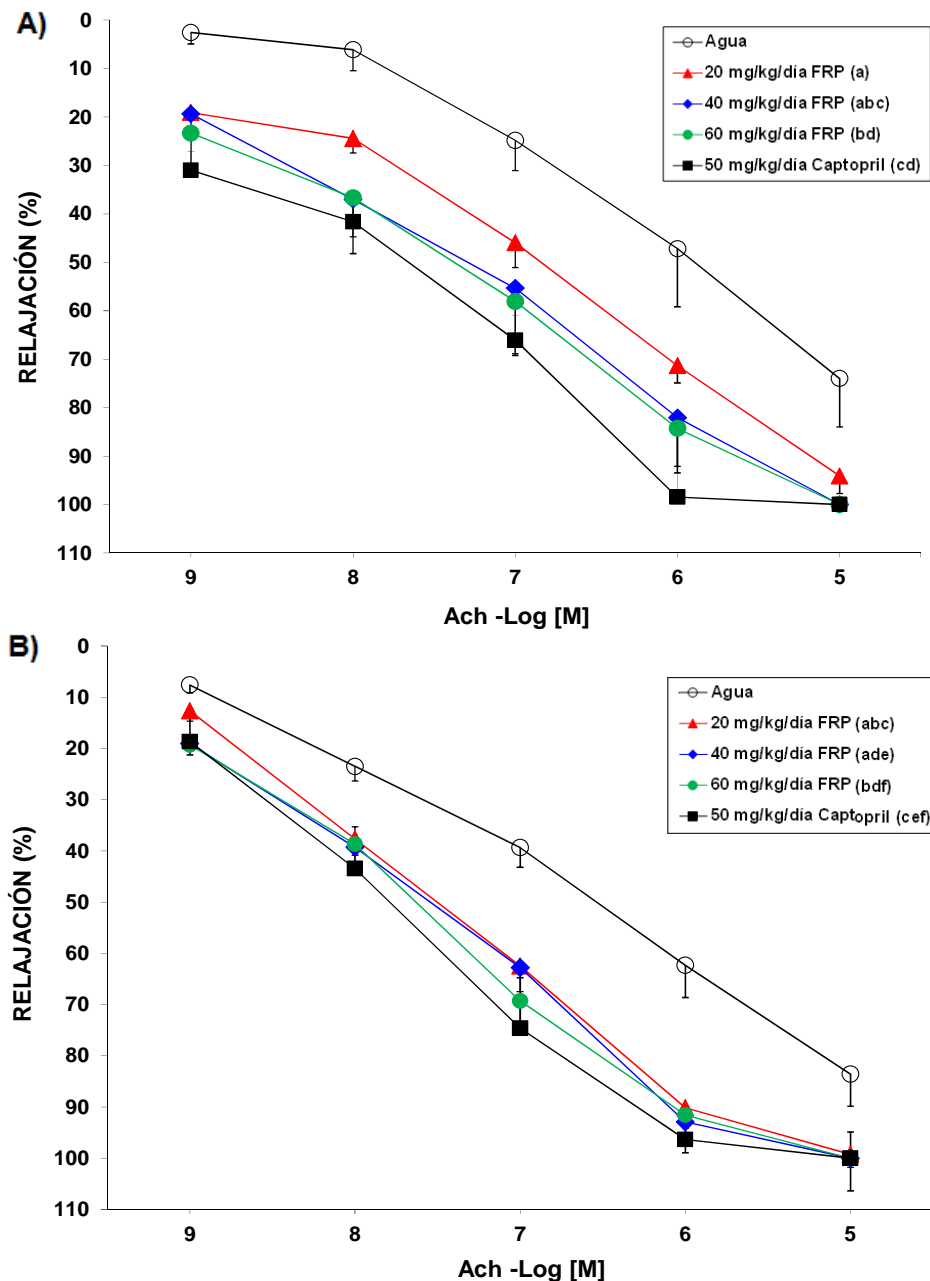


Figura 47. Curvas concentración-respuesta acumulativa de acetilcolina (ACh) en anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas, con 20 (A) y 24 (B) semanas de vida. Desde las 5 hasta las 20 semanas de vida (período de tratamiento = T) las ratas ingerían diariamente en el biberón agua (O), 50 mg/kg de Captopril (■) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP): 20 mg/kg (▲), 40 mg/kg (◆) y 60 mg/kg (●). Desde las 20 hasta las 24 semanas de vida (período de retirada del tratamiento = R) todas las ratas bebían agua. Los datos representan la media \pm EEM para 10 animales en T y para 5 animales en R. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$). P se estimó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni.

Tabla 15. Valores de la relajación provocada por acetilcolina (ACh) en anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas con 20 semanas de vida. Desde la semana 5 hasta la semana 20 de vida (período de tratamiento) las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 5 ensayos homogéneos, y cada uno de los anillos utilizados para estos ensayos procedía de un animal distinto.

ACh (M)	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg/día	FRP 20 mg/kg/día	FRP 40 mg/kg/día	FRP 60 mg/kg/día
10 ⁻⁹	2,56 \pm 2,36	30,99 \pm 3,82	19,08 \pm 1,51	19,36 \pm 3,87	23,31 \pm 6,91
10 ⁻⁸	6,12 \pm 4,33	41,64 \pm 4,77	24,42 \pm 3,03	36,10 \pm 11,19	36,66 \pm 8,08
10 ⁻⁷	24,82 \pm 6,22	66,10 \pm 5,18	45,97 \pm 5,13	55,35 \pm 13,50	58,09 \pm 11,11
10 ⁻⁶	47,17 \pm 12,00	98,45 \pm 6,40	71,32 \pm 3,59	82,07 \pm 10,02	84,28 \pm 9,19
10 ⁻⁵	74,00 \pm 10,00	100,00 \pm 0,00	94,13 \pm 3,62	100,00 \pm 0,00	100 \pm 0,00

Tabla 16. Valores de la relajación provocada por acetilcolina (ACh) en anillos de aorta de ratas espontáneamente hipertensas con 24 semanas de vida. Durante el período comprendido entre la semana 5 y la semana 20 de vida, las ratas ingerían diariamente agua (control negativo), 50 mg/kg de Captopril (control positivo) o diferentes dosis de FraxiPure (FRP). Sin embargo, a partir de la semana 20 de vida, todas las ratas ingerían agua. Los valores representan la media \pm EEM para un mínimo de 5 ensayos homogéneos, y cada uno de los anillos utilizados para estos ensayos procedía de un animal distinto.

ACh (M)	AGUA	CAPTOPRIL 50 mg/kg/día	FRP 20 mg/kg/día	FRP 40 mg/kg/día	FRP 60 mg/kg/día
10^{-9}	7,59 \pm 1,55	18,68 \pm 6,32	12,65 \pm 2,03	19,09 \pm 3,36	19,31 \pm 1,95
10^{-8}	23,51 \pm 2,86	43,43 \pm 8,16	37,64 \pm 3,19	39,29 \pm 5,66	38,69 \pm 3,91
10^{-7}	39,37 \pm 3,82	74,63 \pm 9,89	62,47 \pm 4,98	62,78 \pm 6,80	69,29 \pm 6,64
10^{-6}	62,33 \pm 6,29	96,30 \pm 5,20	90,14 \pm 3,99	92,90 \pm 3,96	91,57 \pm 7,35
10^{-5}	83,56 \pm 6,27	100,00 \pm 5,15	99,23 \pm 2,55	100,00 \pm 3,77	100,00 \pm 6,34

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral, hemos podido demostrar que el extracto FRP, un extracto acuoso de las semillas del fresno común (*Fraxinus excelsior* L.), disminuye la presión arterial de las ratas SHR. Este modelo animal es uno de los más utilizados para investigar el posible efecto antihipertensivo de distintos componentes alimentarios bioactivos (Hellstrom et al., 2010; Park et al., 2010; Balti et al., 2012), y no hay que olvidar que la investigación planteada en esta Tesis Doctoral se realiza para saber si el extracto FRP podría utilizarse en algún momento como ingrediente de algún alimento funcional.

Inicialmente pudimos comprobar que la administración aguda del extracto a las ratas SHR, por vía intragástrica, ocasionaba en ellas una clara disminución de la PAS. De todas las dosis de FRP administradas, la dosis de 20 mg/kg fue la que se consideró que producía el efecto antihipertensivo máximo en estos animales. La dosis de 30 mg/kg de FRP disminuyó más la PAD de las ratas, pero consideramos más relevantes los resultados obtenidos con el extracto sobre la PAS y 20 mg/kg de FRP disminuyeron más esta variable. Hay que tener en cuenta que cuando un compuesto es capaz de bajar la PAS, se asume que su utilidad clínica va a ser buena, ya que esta variable es más difícil de controlar que la PAD. Además, los valores altos de PAS se relacionan en mayor medida con el riesgo de aparición de eventos cardiovasculares (Kaplan et al., 2004). Es decir, unos buenos resultados sobre la PAS son suficientes para poder afirmar que las propiedades antihipertensivas de un compuesto son adecuadas. Por otra parte, también hay que tener en cuenta que la medida de la presión arterial se evaluó utilizando el método del manguito en la cola y, con este método, resultan siempre más fiables las medidas de la PAS que las medidas de la PAD. De hecho, los primeros equipos utilizados para medir la presión arterial en la rata mediante la técnica del manguito en la cola, únicamente proporcionaban medidas fiables de la PAS. Los equipos actuales permiten medir también la PAD, pero todavía siguen resultando más precisas y

reproducibles las medidas de la PAS. Los datos de la PAD presentan con frecuencia una variabilidad importante, y los EEM que definen estas medidas pueden ser elevados.

Consideramos, por consiguiente, que la dosis de 20 mg/kg de FRP era la dosis del extracto que ocasionaba la disminución más acusada de la presión arterial en las ratas SHR, y los mayores descensos de la PAS producidos por el extracto se observaron 4 horas después de la administración de esta dosis. Hay no obstante que señalar que, en los ensayos de administración intragástrica, la mayor disminución de la presión arterial se observó al administrar 50 mg/kg de Captopril, que, como bien sabemos, es un fármaco antihipertensivo de reconocida eficacia clínica. En este contexto, es importante tener en cuenta que nuestro grupo de investigación, antes de realizar este estudio, había caracterizado esta dosis de Captopril, como la dosis de este fármaco que ocasiona el efecto máximo en ratas SHR, tras su administración intragástrica (Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009).

Como mencionamos en la Introducción de esta Tesis Doctoral, Eddouks et al., en 2005, pudieron comprobar que otro extracto de semillas de fresno común, distinto de FRP, producía una disminución significativa de la presión arterial en las ratas SHR. Este extracto también disminuía la presión arterial de las ratas WKY, consideradas el control normotenso de las ratas SHR. Nuestros resultados en ratas WKY con FRP, no coinciden con los resultados obtenidos en estos animales por Eddouks et al., en 2005, ya que el extracto FRP que nosotros hemos ensayado no mostró ningún efecto en las ratas WKY normotensas. De todos modos, Eddouks et al. observaron disminuciones mayores de la presión arterial en las ratas SHR, que en las ratas WKY, y hay además que tener en cuenta que el diseño de los ensayos de estos investigadores era algo diferente del nuestro. Eddouks et al. administraban también 20 mg/kg de su extracto de fresno a las ratas, por vía intragástrica, pero esta dosis la administraban diariamente, durante 3 semanas, y realizaban medidas semanales de la presión arterial. En nuestro caso, se administraban dosis únicas por esta vía, se realizaban medidas de

la presión arterial a intervalos de dos horas, durante ocho horas, y se llevaba a cabo alguna medida adicional 24 y 48 horas después de la administración. La discrepancia entre los resultados de Eddouks et al. y los nuestros pueden estar además relacionadas con la composición de los extractos ensayados, pues los procedimientos para la preparación de ambos extractos no fueron exactamente iguales. Algunas de las condiciones establecidas para la obtención de estos extractos, pueden, en concreto, determinar los compuestos activos contenidos en ellos. En este contexto, podemos mencionar que el solvente para la extracción de FRP era agua, pero Eddouks et al. utilizaron una solución de NaCl al 0,9% (suero fisiológico) para la obtención de su extracto. Además, el tiempo de extracción fue mucho mayor en el caso de FRP (2 horas), que en el caso del extracto utilizado por Eddouks et al. (10 minutos), y la temperatura fue, sin embargo, mucho más alta en este último caso (100 °C), que en el caso de FRP (65 °C). Las diferencias en la temperatura son desde luego importantes, pues, en general, cuando se obtienen extractos de plantas, la temperatura seleccionada para el procesado y el almacenamiento, es un factor importante que condiciona el contenido final en fitoquímicos. En cualquier caso, nuestros resultados indican que el efecto antihipertensivo del extracto FRP puede apreciarse en dosis bajas, y también que este efecto es específico de la condición de hipertensión. Estas premisas representan desde luego una ventaja para su posible utilización como ingrediente alimentario antihipertensivo.

En esta Tesis Doctoral, no pudimos sin embargo demostrar una clara relación dosis-respuesta cuando administrábamos de forma aguda por vía intragástrica, distintas dosis de FRP a las ratas SHR. La administración de las dosis más bajas de FRP (5 y 10 mg/kg) causó también descensos significativos de la PAS en estos animales, y es verdad que con estas dosis el efecto fue menor que el efecto producido por 20 mg/kg de FRP. Podemos por lo tanto decir que, cuando se administra este extracto, se aprecia una relación dosis-respuesta clara hasta la dosis de 20 mg/kg. Sin embargo, la relación dosis-respuesta no pudo apreciarse con dosis más altas, ya que las

dosis mayores no causaron un efecto mayor. En realidad, la administración de 40 mg/kg de FRP ni siquiera disminuyó de forma significativa la PAS de las ratas. Hay sin embargo que tener en cuenta que también hemos observado una paradoja similar en otras ocasiones, cuando estudiábamos en ratas SHR algunos polifenoles y algunos compuestos ricos en polifenoles (Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009; Quiñones et al., 2009; Fernández-Vallinas et al., 2012). En todos estos estudios, paradójicamente, las dosis más altas administradas a las ratas, por vía intragástrica, producían efectos menos acusados que la administración por esta misma vía de otras dosis más bajas del compuesto en cuestión. Los resultados de esta Tesis Doctoral indican que esta paradoja no sería exclusiva de los polifenoles, ya que podría observarse también con otros fitoquímicos. En algunos casos, es difícil probar científicamente la relación entre el contenido de fitoquímicos de los productos naturales y su efecto saludable. Existen además problemas para sacar conclusiones generales que puedan aplicarse a todos los fitoquímicos, ya que sus estructuras son muy diversas, pero, a pesar de todo, es importante tener en cuenta que FRP se comportó en las ratas SHR como algunos otros compuestos antihipertensivos ricos en polifenoles con los que nosotros hemos trabajado anteriormente. Muchos de los efectos beneficiosos de los polifenoles están relacionados con sus efectos antioxidantes. Sin embargo, algunos investigadores señalan que cantidades altas de polifenoles pueden ejercer efectos pro-oxidantes en vez de antioxidantes (Azam et al., 2004; Cotelle et al., 2001; Lahouel et al., 2006). La caracterización por cromatografía de FRP reveló que este extracto contenía compuestos fenólicos y secoiridoides (Ibarra et al., 2011). Todos estos fitoquímicos podrían presentar a dosis altas efectos contrarios a los que presentan en dosis menores. Los fitoquímicos pueden, en realidad, presentar un fenómeno denominado hormesis, que hemos definido en la Introducción de esta Tesis Doctoral. En esencia, este fenómeno consiste en el efecto estimulador de una sustancia, que a mayor concentración es inhibidora. Los fitoquímicos denominados xenohorméticos, en particular, parece que podrían comportarse así frente a especies superiores, y este

comportamiento explicaría, al menos parcialmente, los efectos de las plantas en los animales. Quizá la conclusión más concreta que podríamos sacar de estos razonamientos es que los fitoquímicos, a dosis altas, pueden llegar a ser tóxicos. Asimismo, deberíamos asumir que, cuando se manejan estos compuestos, no debemos sobrepasar ciertas dosis, si queremos obtener los efectos más saludables.

En esta Tesis Doctoral, también intentamos dilucidar el mecanismo por el cual FRP disminuía la presión arterial de las ratas SHR. En realidad, el reglamento relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos, que figura en el código alimentario (*Codex Alimentarius*) regulado por la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la OMS (Reglamento CE N° 1924/2006), establece que es necesario demostrar las propiedades funcionales alegadas, pero este reglamento también sugiere que se estudien los mecanismos de acción implicados en los efectos demostrados.

Teniendo en cuenta que muchas plantas tienen propiedades diuréticas y natriuréticas (Wright et al., 2007), y que el extracto de semillas de fresno ensayado en 2005 por Eddouks et al. también presentaba estas propiedades en las ratas SHR (Eddouks et al., 2005), consideramos importante investigar el posible efecto diurético de FRP. Si podíamos demostrar las propiedades diuréticas de FRP en las ratas SHR, también podríamos entender su efecto antihipertensivo en estos animales.

La creatinina se filtra en los glomérulos y, en condiciones normales, no se reabsorbe en los túbulos renales en cantidad apreciable. Además, sólo una pequeña cantidad se secreta activamente. Por eso, la determinación del Acr se utiliza para evaluar la función renal. Esta determinación sirve para el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia renal y para el control de la diálisis renal. Como ya sabemos, la medida de la creatinina se emplea también para calcular la FE de otros analitos.

La hipertensión en las ratas SHR puede acompañarse de alteraciones orgánicas, tales como hipertrofia cardíaca, fallo cardíaco y disfunción renal. De hecho, estos animales, cuando alcanzan una edad avanzada, pueden

presentar proteinuria y una disminución del Acr, pero no se ha descrito que las ratas SHR presenten un claro fallo renal (Pinto et al., 1998). En cualquier caso, nosotros no pudimos apreciar diferencias entre las ratas de los distintos grupos, cuando medíamos su Acr.

La urea se forma por el metabolismo hepático de los aminoácidos que no se usan en la síntesis de proteínas. Por lo tanto, la producción de urea está aumentada cuando se metabolizan más aminoácidos en el hígado, y está disminuida cuando existe una reducción en la síntesis de proteínas. La insuficiencia renal se relaciona con un aumento de urea en sangre. En esta Tesis Doctoral, tampoco pudimos apreciar diferencias entre las ratas de los distintos grupos, cuando medíamos su FEU. Por lo tanto, todas ellas tenían una función renal semejante.

FRP aumentó claramente la EVO de las ratas SHR. Tal como se ha señalado en el apartado 3.2.2. de esta Tesis Doctoral, la EVO representa el porcentaje de líquido ingerido que se recolecta en orina. Por lo tanto, podemos decir que FRP se comporta como un diurético. Como ya hemos señalado, el extracto de semillas de fresno estudiado por Eddouks et al. en 2005, mostró también efecto diurético en las ratas SHR. Este extracto aumentó asimismo la EVO de las ratas WKY, pero hay que recordar que, a diferencia de FRP, el extracto ensayado por Eddouks et al. también disminuía la presión arterial en estos animales normotensos. Sin embargo, otros extractos obtenidos a partir de las hojas de *Fraxinus excelsior* L. no han mostrado efectos diuréticos en ratas (Casadebaig et al., 1989).

En esta Tesis Doctoral, los efectos de FRP sobre la diuresis y la presión arterial se compararon con los efectos de algunos fármacos. Entre ellos, la Furosemida, que es un diurético que inhibe el cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$. Los diuréticos que inhiben este cotransportador en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, se conocen como diuréticos del asa. También se les ha denominado diuréticos de "techo alto", porque su acción es muy intensa y se inicia de forma rápida, con independencia del equilibrio ácido-básico del organismo. La diuresis máxima que inducen estos agentes es por lo tanto muy superior a la que provocan otros fármacos. Nos resultó por eso

sorprendente que la administración de 10 mg/kg de Furosemida, una dosis que presentaba efecto diurético en ratas Sprague-Dawley (Ramírez et al., 2006), no mostrase casi efecto sobre la EVO en las ratas SHR, ni disminuyese la presión arterial de estos animales. Sobre este particular, podemos argumentar que los diuréticos resultan menos eficaces en las ratas SHR que otros fármacos antihipertensivos (Pinto et al., 1998). Algunos autores señalan que los riñones de las ratas SHR responden incluso menos que los riñones de las ratas WKY a algunos diuréticos como Furosemida y Clorotiazida (Bindels et al., 1987), pero otros, sin embargo, afirman que la Furosemida presenta efectos diuréticos y natriuréticos en ratas SHR y en ratas WKY (Fujimura & Ebihara, 1989; Uchida et al., 1992). En esta Tesis Doctoral, obtuvimos el valor de la EVO en las ratas 4 horas después de administrar Furosemida. Quizá la EVO podía haberse estimado también en algún otro momento después de esta administración. No obstante, el efecto de este fármaco dura en humanos 4 horas (Scheen et al., 1986) y en perros 6 horas (Uechi et al., 2003). Además, otros investigadores también han señalado que los efectos de este diurético en ratas aparecen pronto (Ramírez et al., 2006). Algunos autores indican que los efectos diuréticos de este fármaco pueden variar dependiendo de la hora en la que se administra, resultando más acentuado el efecto, si se administra a las 10 h, en lugar de a las 22 h (Fujimura & Ebihara, 1989). Por lo tanto, los efectos diuréticos de la Furosemida en ratas SHR se han debatido mucho, y en ocasiones no se ha podido comprobar que este fármaco tuviera efectos diuréticos demasiado relevantes en estos animales.

Los electrolitos sodio (Na^+), cloro (Cl^-) y potasio (K^+) están implicados en casi todas las funciones metabólicas del organismo. Estos iones son los más importantes desde el punto de vista fisiológico y son los electrolitos que se analizan más frecuentemente. El Na^+ es el principal catión extracelular y mantiene la presión osmótica del líquido extracelular. El K^+ es el principal catión intracelular y tiene importancia crítica para la actividad celular nerviosa y muscular. El Cl^- constituye el anión extracelular más importante del organismo y sirve para regular el equilibrio extracelular de distribución de

líquidos.

Aunque no pudimos demostrar un efecto de la Furosemida sobre la EVO, en esta Tesis Doctoral comprobamos que la FENa y la FECl de las ratas tratadas con este fármaco fueron, a pesar de todo, ligeramente más altas que los correspondientes valores en los animales a los que se les administraba agua. El aumento de la FENa y de la FECl producido por Furosemida está desde luego en consonancia con los efectos usuales de los diuréticos del asa, grupo farmacológico al que pertenece este fármaco.

En esta Tesis Doctoral, también comparamos los efectos de FRP con los efectos de la Torasemida, un diurético que pertenece también al grupo de los diuréticos del asa. La Torasemida se empezó a utilizar más tarde que la Furosemida en clínica, y resultó mucho más potente que esta última en los estudios realizados para evaluar el efecto diurético de ambos compuestos a distintas dosis (Brater et al., 1987, Gerbes et al., 1993). La Torasemida también se vio que era mucho más potente que la Furosemida en ratas (Uchida et al., 1992). Más aún, la Torasemida tiene un efecto diurético mucho más prolongado que la Furosemida, cuando se utilizan dosis equipotentes de ambos compuestos (Dunn et al., 1995). No nos resultó por todo ello sorprendente que en esta Tesis Doctoral, 1 mg/kg de Torasemida aumentase de forma considerable la EVO, la FENa y la FECl en las ratas SHR. Por otra parte, cuando administrábamos 1 mg/kg de Torasemida a estos animales, este fármaco causó una pérdida apreciable, aunque no significativa, de K^+ en ellos. Esto no nos resultó extraño, ya que la pérdida de este electrolito caracteriza también a los fármacos diuréticos inhibidores del cotransportador $Na^+-K^+-2Cl^-$.

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el organismo humano. Este ácido se determina en el diagnóstico y el tratamiento de numerosos trastornos renales y metabólicos, tales como la insuficiencia renal, la gota, la leucemia, la psoriasis, la inanición y otros trastornos nutricionales, así como en pacientes bajo tratamiento con citostáticos. Los animales tratados de forma aguda con 1 mg/kg de Torasemida acusaron efectos uricosúricos muy acentuados, y este efecto

está también en consonancia con el perfil de acción que caracteriza a los inhibidores de este cotransportador. Estos fármacos aumentan la FEAU cuando se administran de forma aguda, pero no cuando se administran de forma crónica, pues su administración crónica ocasiona una disminución de la excreción de ácido úrico.

El calcio es el elemento mineral más abundante en el organismo. El 99% aparece almacenado en los huesos, prioritariamente como hidroxapatita. El calcio restante se encuentra distribuido entre varios tejidos y líquidos extracelulares, desempeñando un papel central en numerosos procesos de sustancial importancia para la vida. Los animales tratados con 1 mg/kg de Torasemida también acusaron un incremento en la FECa, que es asimismo característico de los diuréticos del asa.

El 88% del fósforo que se encuentra en el organismo se localiza en los huesos, en forma de fosfato cálcico. El fósforo restante participa en el metabolismo intermediario de los carbohidratos y se halla en sustancias fisiológicamente importantes como los fosfolípidos, los ácidos nucleicos y el ATP. Algunos de los diuréticos inhibidores del cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ también se comportan como inhibidores de la anhidrasa carbónica, y aumentan por eso la FEP. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral, ni Furosemida ni Torasemida aumentaron la FEP.

Torasemida presentó por consiguiente el perfil de acción que caracteriza a los diuréticos del asa. De todos los compuestos utilizados, este fármaco fue el que mostró además un efecto sobre la diuresis más acentuado, pero, lo cierto es que, nuestro principal objetivo en esta Tesis Doctoral era dilucidar si FRP presentaba efectos diuréticos. La EVO de los animales tratados con 20 mg/kg de FRP no fue significativamente distinta de la EVO de los animales tratados con 1 mg/kg Torasemida, pero el aumento de la EVO producido por FRP se acompañó de una disminución de la PAS en las ratas, que fue sin lugar a dudas mayor que la disminución de esta variable ocasionada en ellas por Torasemida. Hay sin embargo que constatar que la EVO se midió 4 horas después de administrar estos compuestos, y era en ese momento cuando se esperaba que la

administración de FRP produjera la máxima disminución de la PAS. Resulta en cualquier caso incuestionable que FRP tiene también propiedades diuréticas, y estas propiedades parecen asociadas a su efecto antihipertensivo, ya que la diuresis y la disminución de la PAS, al administrar el extracto, se manifiestan en forma coincidente. Respecto al perfil diurético de FRP, podemos decir que este extracto mostró solo leves propiedades natriuréticas, ya que aumentó solo ligeramente la FENa, pero se comportó, sin lugar a dudas, como un diurético ahorrador de K^+ . La administración de 20 mg/kg de FRP causó, además, una disminución de la FEP en las ratas, que debería ser objeto de una investigación más detallada.

Los efectos renales de FRP también se compararon con los efectos renales de Captopril, un fármaco que no se utiliza habitualmente como diurético, pero que ha mostrado efectos diuréticos en voluntarios sanos (Leary et al., 1985) y en pacientes con insuficiencia cardíaca moderada (Odemuyiwa et al., 1989). En esta Tesis Doctoral, la administración de 50 mg/kg de Captopril se utilizó como control positivo en los estudios realizados para evaluar el posible efecto antihipertensivo de FRP. La administración de esta dosis del fármaco produjo una clara disminución de la PAS en las ratas SHR, y la disminución de la PAS 4 horas después de esta administración era semejante a la disminución de esta variable constatada 4 horas después de la administración de 20 mg/kg de FRP. Este hecho pone de manifiesto nuevamente la eficacia antihipertensiva de FRP. Captopril no ocasionó sin embargo ningún efecto diurético en las ratas, pero promovió en ellas un moderado incremento en la FENa y FEK. Los estudios sobre los efectos renales de los IECA aportan desde luego resultados muy variados (McCaa & Gilliespie, 1984; Brunkhorst et al., 1989; Hirsch et al., 1992; Motwani et al., 1992). En algunos estudios, la administración crónica de estos fármacos ocasionó un descenso de la presión arterial y un efecto natriurético, ambos mediados por la inhibición en la formación de angiotensina II (McCaa & Gillespie, 1984). Brunkhorst et al., en 1989, también comprobaron que Captopril inducía un incremento significativo en la excreción de Na^+ en pacientes con cirrosis hepática y ascitis. Hirsch et al., en 1992, no pudieron

demostrar que existieran cambios en el volumen de orina y en la excreción de Na^+ o K^+ de las ratas con fallo cardíaco tratadas con Captopril, pero, por el contrario, estos investigadores observaron que el Enalapril, otro inhibidor de la ECA, aumentaba en un 80% y en un 10%, respectivamente, el volumen urinario y la excreción diaria de Na^+ de estas ratas. La dosis de Captopril parece que es importante a la hora de analizar los efectos natriuréticos de este fármaco, pues se comprobó que una dosis muy baja (1 mg de Captopril) aumentaba significativamente la natriuresis inducida por Furosemida, y que, sin embargo, la dosis estándar (25 mg de Captopril) atenuaba ligeramente la respuesta natriurética de este diurético (Motwani et al., 1992). Adicionalmente, el estudio llevado a cabo por Leary et al., en voluntarios sanos, señaló que Captopril tenía propiedades uricosúricas (Leary et al., 1985). Sin embargo, en esta Tesis Doctoral, la FEAU de las ratas tratadas con Captopril fue menor que la correspondiente FEAU del grupo de animales a los que se les administraba agua.

Deberíamos considerar cuáles son exactamente los compuestos presentes en FRP, y analizar a través de qué mecanismos estos compuestos podrían ocasionar una disminución de la presión arterial, pues otros procesos, distintos del incremento en la diuresis, podrían también estar implicados en el efecto antihipertensivo de FRP. Ya hemos señalado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, que la caracterización por cromatografía de FRP reveló que este extracto contenía compuestos fenólicos y secoiridoides (Ibarra et al., 2011). Lo cierto es que las propiedades beneficiosas de muchas plantas se han atribuido a la presencia en ellas de compuestos que contienen en su estructura grupos fenol, o compuestos que presentan estructuras terpénicas, como las de los iridoides. En la Introducción de esta Tesis Doctoral, también se ha mencionado que los iridoides, un grupo muy extendido de monoterpenos, son responsables de las propiedades saludables de algunas plantas como el olivo o el noni, y que existen incluso preparados de estas plantas que se han comercializado para su utilización como alimentos funcionales. Los iridoides con capaces de conservar su composición química incluso cuando se exponen a situaciones

o procesos agresivos, y pueden considerarse más estables y más biodisponibles que otros compuestos fenólicos conocidos, como los flavonoides. Por lo tanto, los productos procesados que contienen iridoides serían, en principio, más capaces de producir un beneficio sobre la salud, que los productos ricos en compuestos fenólicos.

En la Introducción de esta Tesis Doctoral, señalamos que FRP es capaz de disminuir la glucemia postprandial y la secreción de insulina en sujetos sanos. Se cree que los responsables de estos efectos son los secoiridoides glucosídicos nuzenida y GI3 que contiene el extracto, y también algunos derivados fenólicos presentes en él (Visen et al., 2009). No podemos desde luego asegurar que estos compuestos sean también responsables de las modificaciones de la presión arterial que se observan en las ratas SHR al administrar FRP. En realidad, se reconocen muchas propiedades biológicas de los iridoides, pero sus efectos sobre la presión arterial se han estudiado muy poco. Sin embargo, se ha demostrado que otro secoiridoide llamado oleuropeína, que se encuentra en el olivo, tiene efecto antihipertensivo en ratas SHR conscientes (Ribeiro et al., 1986) y en ratas tratadas con L-NAME (Khayyal et al., 2002). También se sabe que los extractos de las hojas de olivo pueden resultar igual de efectivos que algunos tratamientos antihipertensivos de uso clínico habitual, tales como el Captopril, para bajar la presión arterial (Susalit et al., 2010). Por todo ello, postulamos que los compuestos con estructura secoiridoide, nuzenida y GI3, que representan al menos el 10% del extracto de fresno estudiado (Flanagan et al., 2013), podrían ser responsables, al menos en parte, de los efectos antihipertensivos observados en esta Tesis Doctoral en las ratas SHR.

Más aún, la nuzenida y el GI3 se han identificado también en otras plantas diferentes del fresno (Macheix et al., 1990; Servili et al., 1999; Silva et al., 2010), y se ha descrito que estos compuestos tienen propiedades antioxidantes y previenen el estrés oxidativo en ratas (Li et al., 2007; Fu et al., 2010). Ya hemos comentado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, que la hipertensión se asocia con un incremento de radicales libres. Estudios clínicos han demostrado que los pacientes hipertensos presentan un

incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Paravicini & Touyz, 2008) y una disminución en la capacidad antioxidante (Sagar et al., 1992; Lee & Griending, 2008; Labiós et al., 2011). Existen por eso numerosos estudios clínicos sobre la utilización de terapias antioxidantes en pacientes hipertensos (Kitiyakara & Wilcox, 1998). En el momento actual, algunas plantas ricas en fitoquímicos antioxidantes están teniendo además un importante impacto en el sector de la alimentación, por sus propiedades antihipertensivas. Por todos estos motivos, decidimos evaluar las propiedades antioxidantes de FRP, como mecanismo que podría también colaborar a su efecto antihipertensivo.

La capacidad antioxidante total del plasma puede medirse con distintas técnicas. Una de ellas es el ensayo fluorimétrico que hemos utilizado en esta Tesis Doctoral. Esta técnica la han utilizado distintos investigadores y también la hemos utilizado nosotros en anteriores estudios. El ensayo proporciona la capacidad del plasma para neutralizar radicales peroxilo. La medida de los niveles de MDA en plasma o tejidos, es también importante a la hora de determinar el grado de oxidación en un organismo, pues la concentración de este metabolito refleja el grado de peroxidación lipídica. Este compuesto se libera en el organismo cuando los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las lipoproteínas plasmáticas, transformándolos en ácidos grasos peroxidados, que sufren un acortamiento de su cadena lateral. La medida del ORAC plasmático, y la cuantificación plasmática y hepática de MDA en las ratas, ha permitido que en esta Tesis Doctoral tengamos una idea bastante real del grado de oxidación que acusaban las ratas SHR. Sabemos que la capacidad antioxidante de un organismo se puede también establecer determinando los valores de GSH en el hígado, ya que este tripéptido es capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno y otros radicales. Por eso, también determinamos GSH en el hígado de las ratas SHR que recibían tratamientos crónicos.

La administración intragástrica de 20 mg/kg de FRP ocasionó un aumento significativo en la capacidad antioxidante total del plasma de las

ratas, y también ocasionó una disminución de los niveles plasmáticos de MDA en estos animales. Hemos comparado además las modificaciones de estos indicadores del estado redox producidas por nuestro extracto, con las producidas por Captopril, ya que los efectos que ejercen los IECA sobre la estructura y función del sistema cardiovascular, el riñón y el cerebro, parecen estar relacionadas con su acción antioxidante y con la disminución de la formación de especies reactivas de oxígeno (Basso et al., 2005). De hecho, el Captopril se ha definido como un captador de radicales libres, debido a su grupo sulfhidrilo terminal (Bagchi et al., 1989; Andreoli, 1993). Algunos estudios *in vitro* indican que este fármaco funciona como agente antioxidante, tanto porque neutraliza los radicales libres (Bagchi et al., 1989; Westlin & Mullane, 1988), como porque aumenta la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la SOD y la GPx (De Cavanagh et al., 1995). Más aún, el Captopril se sabe que puede disminuir las concentraciones plasmáticas de peróxidos lipídicos en los pacientes diabéticos (Ha & Kim, 1992) y que aumenta la capacidad antioxidante en los pacientes hipertensos (Schneider et al., 1990). Sin embargo, en esta Tesis Doctoral, la administración aguda de Captopril no aumentó la capacidad antioxidante total del plasma de las ratas SHR, pese a que FRP aumentaba marcadamente este parámetro. FRP disminuyó además, más que el Captopril, la concentración plasmática de MDA en estos animales. Todos estos datos sustentan la hipótesis de que la capacidad antioxidante de FRP, debida en principio a los compuestos fenólicos y secoiridoides que contiene, podría justificar, al menos en parte, sus efectos antihipertensivos.

Por todo ello, podemos decir que FRP presenta efectos antihipertensivos en las ratas SHR cuando se administra de forma aguda, y que, cuatro horas después de su administración, estos efectos son comparables en magnitud con los efectos antihipertensivos de 1 mg/kg de Torasemida o de 50 mg/kg de Captopril, resultando además mucho más acentuado el efecto antihipertensivo de este extracto en las ratas SHR, que el efecto antihipertensivo de 10 mg/kg de Furosemida. Los resultados comentados hasta este momento nos permiten también decir que FRP se

comporta además como un diurético ahorrador de K^+ en las ratas SHR. Sus propiedades diuréticas, junto con sus propiedades antioxidantes, podrían ser responsables de los efectos beneficiosos que ocasiona este extracto sobre la presión arterial.

La hipertensión es una patología crónica que requiere tratamiento crónico y, por otra parte, no todos los compuestos capaces de disminuir la presión arterial tras su administración aguda, son útiles para el tratamiento de esta patología. En base a estas ideas, en esta Tesis Doctoral, nos pareció imprescindible llevar también a cabo un estudio para evaluar el efecto de la administración crónica de FRP en las ratas SHR. Administramos por ello distintas dosis de este extracto en el agua de bebida, a estos animales, durante un período prolongado de tiempo. Algunos investigadores, y también nuestro grupo de investigación, han señalado que existe una fase inicial en la vida de las ratas SHR, en la cual la presión arterial aumenta de forma muy rápida (Cabassi et al., 1997; Miguel et al., 2005; Miguel et al., 2006). Después de este periodo, la presión se estabiliza usualmente y fluctúa poco, pese a que se mantiene en niveles muy altos.

La administración crónica de FRP en nuestro estudio comenzó cuando las ratas se destetaban, y se evaluó inicialmente el efecto del extracto sobre el desarrollo de la hipertensión en esta cepa. Sin embargo, como la administración continuó hasta que las ratas SHR tenían 20 semanas de vida, pudimos analizar también los efectos del extracto durante la fase de la vida de estos animales en la que la presión arterial se considera prácticamente estable. Se utilizó como control negativo un grupo de ratas que bebía agua, y como control positivo un grupo de ratas que se trataba diariamente con 50 mg/kg de Captopril, hasta las 20 semanas de vida. En el estudio de administración crónica, quisimos además analizar lo que sucedía cuando se retiraban los tratamientos. Por eso, el período experimental se prolongó durante algunas semanas más, en las que las ratas de todos los grupos bebían agua. Esto nos permitió evaluar la posible reversión de los efectos de FRP y Captopril en estos animales. Durante todo el período experimental, se registró además el peso corporal de las ratas, y se estimó

su ingesta líquida y su ingesta sólida. Comentaremos a continuación los resultados correspondientes.

En nuestro estudio de administración crónica, pudimos comprobar que las ratas SHR que ingerían agua a lo largo de todo el período experimental acusaban un aumento inicial brusco de su presión arterial. Después, esta variable permanecía en ellas más estable. Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral, pudimos diferenciar claramente el período en el que se desarrollaba la hipertensión de las ratas SHR, y el período de estabilización de la presión arterial en estos animales. La administración crónica de FRP atenuó ligeramente el desarrollo de la hipertensión en las ratas SHR, pero las ratas tratadas con el extracto presentaban de todos modos cifras de presión arterial muy altas cuando alcanzaban las 10-11 semanas de vida. Las ratas SHR tratadas con 50 mg/kg/día de Captopril mostraron un incremento de la presión arterial mucho menor que los restantes grupos durante la fase inicial de la vida de estos animales, y podemos decir que este tratamiento frena en buena medida el desarrollo de la hipertensión en las ratas de esta cepa. Los animales tratados con 50 mg/kg/día de Captopril también mostraron cifras mucho menores de presión arterial que los restantes grupos entre las 11 y las 20 semanas de vida, que es el período en el que esta variable presenta valores más estables. Los descensos de la PAS ocasionados por FRP fueron, por consiguiente, siempre menores que los descensos de esta variable causados por 50 mg/kg de Captopril, pero esto no es extraño, pues Captopril es un fármaco antihipertensivo muy eficaz y la dosis de este fármaco utilizada fue alta. Sin embargo, lo que habría que resaltar es que el efecto antihipertensivo de FRP durante la fase de estabilización de la hipertensión, fue muy constante y mantenido, y no se produjeron grandes variaciones de la PAS durante la administración del extracto. Una disminución semejante de esta variable, es decir, una disminución de la misma suave pero mantenida, podría resultar ventajosa en los pacientes hipertensos, pues se sabe que los descensos repentinos y excesivos de la presión arterial pueden aumentar el riesgo de que aparezcan otros problemas distintos de la propia hipertensión. Algunos investigadores

sugieren en realidad que la variabilidad en los niveles de presión arterial no es muy recomendable. La fluctuación de esta variable puede contribuir a la aparición de daño orgánico, y puede aumentar el riesgo cardiovascular en pacientes hipertensos (Parati & Mancia, 2001; Pringle et al., 2003). De hecho, un descenso brusco de la presión arterial puede facilitar la producción de infartos de corazón, y puede disminuir la probabilidad de supervivencia en los pacientes hipertensos (Cruickshank et al., 1987; Furberg et al., 1995; Psaty et al., 1995).

La administración de 40 mg/kg/día de FRP a las ratas SHR, ocasionó un efecto sobre la presión arterial de estos animales muy semejante al efecto que había causado en ellos la administración de 20 mg/kg/día del extracto. La administración de 60 mg/kg/día de FRP causó también en ellos una disminución de la presión arterial en las ratas SHR, pero, curiosamente, la disminución fue algo menor que la observada al administrar las dosis anteriores. Es decir, al igual que sucedía cuando se administraban dosis de FRP de forma aguda, la dosis más alta de este extracto tampoco producía los mayores efectos. No podemos sin embargo olvidar que los compuestos que contiene FRP son fitoquímicos. Nos hemos referido al fenómeno de hormesis en la Introducción de esta Tesis Doctoral y también anteriormente en esta Discusión. Sabemos en realidad que existen fitoquímicos denominados xenohorméticos, que son capaces de producir una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas (Manchado et al., 2005). Es importante además constatar que nuestro grupo de investigación también ha podido observar una paradoja similar con diferentes dosis de un cacao rico en polifenoles, que se administraban a las ratas SHR de forma crónica (Quiñones et al., 2010). Las relaciones dosis-respuesta son por lo tanto difíciles de establecer cuando se administran algunos fitoquímicos, tanto si la administración es aguda como si la administración es crónica.

En nuestro estudio de administración crónica, pudimos observar que cuando se retiraron los tratamientos con FRP o Captopril, la presión arterial de las ratas aumentaba de forma gradual. De hecho, desde que las ratas tenían 22 semanas de vida, los valores de la PAS fueron muy similares en

los animales que habían recibido tratamiento con FRP y en los que habían bebido siempre agua. La reversión del efecto tras retirar un tratamiento crónico con un compuesto antihipertensivo, es una prueba adicional de la bioactividad de este compuesto. Podemos por ello decir que los resultados obtenidos tras retirar el tratamiento con FRP nos permiten reafirmar que este extracto tiene propiedades antihipertensivas. Algo similar sucedió en otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación, y también en algunos estudios de otros investigadores, cuando se interrumpía la administración de un ingrediente o alimento bioactivo (Sipola et al., 2002; Miguel et al., 2005; Miguel et al., 2006; Quiñones et al., 2010). La PAS de las ratas que se habían tratado de forma crónica con Captopril también aumentó cuando el tratamiento con este fármaco se interrumpió. Sin embargo, la reversión del efecto fue menos pronunciada en este caso. Esto no es extraño, porque como ya se ha comentado anteriormente, Captopril es un importante agente antihipertensivo y nosotros administrábamos a las ratas una dosis de este fármaco muy alta (50 mg/kg/día). Los animales tratados con Captopril presentaron, por lo tanto, niveles de PAS siempre mucho menores que los restantes grupos de animales. Kost et al. también comprobaron que las ratas SHR que se habían tratado con Captopril, acusaban sólo un ligero incremento de su presión arterial después de retirar el tratamiento con este fármaco (Kost et al., 2000).

En el estudio de administración crónica, las ratas SHR que recibían tratamiento con Captopril ganaron peso corporal más lentamente que las otras ratas, pese a que estos animales no acusaban un aumento en la ingesta sólida. Este hecho está en consonancia con algunos estudios realizados por otros investigadores que indican que el bloqueo del sistema renina-angiotensina retrasa la ganancia de peso corporal en esta cepa de ratas (Chow et al., 1997). Las ratas SHR tratadas con las dosis mayores de FRP (40 mg/kg/día y 60 mg/kg/día) mostraron sin embargo un aumento del peso corporal, respecto a las ratas del grupo control negativo, que bebieron únicamente agua a lo largo del estudio. La ingesta sólida de los animales tratados con estas dosis del extracto también era mayor que la ingesta sólida

de las ratas del grupo control negativo. Parece, por lo tanto, que el extracto utilizado podría tener un efecto orexigénico dosis dependiente. Este posible efecto orexigénico debería estudiarse con más profundidad, pues, si bien el extracto podría utilizarse también como estimulante del apetito, el incremento de la ingesta no sería en general muy recomendable en pacientes hipertensos. Podemos de todos modos puntualizar que, al menos en las ratas SHR, hemos conseguido efectos mantenidos sobre la presión arterial con la administración continuada de una dosis de FRP (20 mg/kg/día) menor que las dosis con efectos orexigénicos en estos animales.

En el estudio de administración crónica, la ingesta líquida resultó muy variable en todos los grupos de animales, pero podemos destacar que aumentó notablemente en el grupo de ratas que bebía la solución de Captopril. Esto no es sorprendente, ya que se ha demostrado que los IECA inducen sed y aumentan la ingesta de agua y la excreción de orina en las ratas (Barney et al., 1980; Fregly & Rowland, 1991). La ingesta líquida de las ratas tratadas con FRP fue sin embargo menor que la ingesta líquida de las ratas que bebían agua. Esta diferencia en la ingesta líquida se apreció especialmente al comenzar el tratamiento con el extracto. Podríamos justificar este hecho en base al sabor amargo que hemos podido apreciar en el extracto, y en base también a la posible adaptación de los animales a este sabor. Las propiedades organolépticas de los ingredientes que se van a incluir en alimentos funcionales son importantes, pues su olor o sabor pueden condicionar la ingesta de estos alimentos. Los resultados de ingesta líquida en las ratas tratadas con FRP sugieren la necesidad de enmascarar el sabor de este extracto para elaborar un alimento funcional con él.

Ya hemos señalado anteriormente que el extracto de fresno estudiado mejora el estado redox de las ratas SHR cuando se administra de forma aguda. La administración crónica de 20 mg/kg/día y 40 mg/kg/día de FRP también aumentó significativamente los valores de ORAC en las ratas SHR, y ocasionó asimismo una disminución de los niveles plasmáticos y hepáticos de MDA en estos animales. Los niveles plasmáticos de MDA de los animales que se habían tratado con 20 mg/kg/día de FRP permanecieron además

más bajos que los de las ratas del grupo control negativo 4 semanas después de retirar este tratamiento. Por lo tanto, la administración crónica de esta dosis de FRP podría ocasionar un efecto antioxidante más duradero que la administración crónica de la dosis de 40 mg/kg/día de FRP. Como anteriormente hemos señalado, la administración de 60 mg/kg/día de FRP disminuyó también significativamente la presión arterial de las ratas, pero sus efectos sobre esta variable fueron menos relevantes que los efectos de las dosis menores (20 mg/kg/día y 40 mg/kg/día). Curiosamente, la administración de 60 mg/kg/día de FRP previno también en menor grado la peroxidación lipídica de las ratas SHR, que las dosis menores del extracto, aunque 60 mg/kg/día de FRP ocasionaron también una disminución significativa de los valores de MDA en el plasma y en el tejido hepático de las ratas. Además, la administración de 60 mg/kg/día de FRP no modificó el ORAC de las ratas SHR, y causó en ellas un ligero descenso en la concentración hepática de GSH, que aumentó algo al retirar el tratamiento. Todo ello nos permite asumir una conexión entre los efectos de FRP sobre la presión arterial de las ratas SHR, y los efectos de este extracto sobre el estado redox de estos animales. En base a nuestros resultados, cabe pensar que el efecto antihipertensivo de FRP en las ratas SHR pudiera deberse, al menos en parte, a sus efectos antioxidantes.

Ya hemos señalado en esta Discusión que el Captopril aumenta la capacidad antioxidante en los pacientes hipertensos (Schneider et al., 1990). También hemos señalado que este fármaco se ha definido como un neutralizador de radicales libres (Bagchi et al., 1989; Andreoli, 1993). Sin embargo, los efectos de Captopril sobre el balance redox fueron también menos acentuados que los efectos de FRP, cuando estos compuestos se administraban de forma crónica. De hecho, la administración de 50 mg/kg/día de Captopril no aumentó la capacidad antioxidante total de las ratas SHR y, aunque modificó significativamente los niveles plasmáticos y hepáticos de MDA, la disminución de los niveles de este metabolito en el hígado fue menor con este tratamiento que con los tratamientos crónicos de FRP. Estos hechos avalan que el extracto de fresno estudiado tiene buenas

propiedades antioxidantes, que podrían mejorar el estado redox de los sujetos hipertensos.

Todos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral nos permiten concluir que el extracto de fresno estudiado presenta efectos antihipertensivos en las ratas SHR. El efecto de este extracto en estos animales fue muy acentuado cuando se administraba de forma aguda y, aunque no fue tan acentuado cuando se administraba de forma crónica, en este último caso, el efecto del extracto se mantuvo mientras se estaba administrando.

En esta Tesis Doctoral, hemos investigado también la funcionalidad del endotelio de los animales tratados crónicamente con FRP. Para ello, hemos evaluado la respuesta de las aortas de estos animales a la Ach. Sabemos que la relajación vascular producida por este agente es dependiente de la presencia de endotelio (Furchgott & Zawadki, 1980), y también sabemos que esta relajación se debe fundamentalmente a la liberación de NO (Furchgott 1999), un mediador al que pueden atacar y destruir los radicales libres. La síntesis endotelial de NO podría aumentar con el tratamiento de FRP, pero lo que resulta más probable es que la biodisponibilidad de este mediador aumente con este tratamiento, ya que este extracto posee efectos antioxidantes y podría neutralizar los radicales libres que lo destruyen. Lo cierto es que nuestros resultados avalan esta hipótesis, pues la relajación provocada por Ach en las aortas de los animales tratados con FRP, fue siempre mayor que la relajación provocada por este compuesto en las aortas de los animales que ingerieron agua. Este incremento en la respuesta relajante de las aortas de los animales que se habían tratado con el extracto, se mantuvo cuatro semanas después de haber retirado el tratamiento con FRP, pero no hay que olvidar que estos animales que habían dejado de ingerir el extracto tenían también niveles plasmáticos de MDA más bajos que sus controles correspondientes. El incremento en la relajación arterial producido por el tratamiento de FRP parece por lo tanto asociado a un mejor balance del estado redox de las ratas, y ello nos reafirma en la idea de que FRP podría mejorar la

biodisponibilidad del NO que libera la Ach en el endotelio. No nos puede por otra parte extrañar que también las aortas de los animales que se habían tratado con Captopril, presentasen un incremento en la respuesta relajante de Ach, ni tampoco nos sorprende demasiado que este incremento haya podido también apreciarse en las aortas de los animales a los que se les había retirado el tratamiento con el fármaco, pues no hay que olvidar que muchos estudios, algunos ya mencionados anteriormente en esta Discusión, avalan que Captopril puede actuar como un neutralizador de radicales libres. De hecho, las ratas tratadas con Captopril de forma crónica presentaron niveles menores de MDA que las ratas del grupo control negativo, y este metabolito también disminuía cuando se administraba este fármaco de forma aguda por vía intragástrica.

Creemos haber cumplido los Objetivos de esta Tesis Doctoral. En último término, los resultados obtenidos en ella nos permiten sugerir que FRP podría utilizarse como ingrediente de un alimento funcional, para la prevención y/o tratamiento de la hipertensión y patologías asociadas. Su eficacia diurética y antioxidante representaría un beneficio en sujetos prehipertensos y en pacientes hipertensos en los que la presión arterial no se hubiera podido controlar adecuadamente con tratamiento farmacológico. Ambos mecanismos, el diurético y el antioxidante, podrían mediar los efectos de FRP sobre la presión arterial.

La potencia de los fármacos no determina en general su utilidad clínica. Sin embargo, la potencia de un compuesto bioactivo que se quiere incluir en un alimento, condiciona siempre la posible utilidad de este alimento como alimento funcional, pues su ingesta deberá ser siempre racional, pero suficiente para producir el efecto. Es decir, sólo podrán utilizarse como ingredientes de alimentos funcionales, los ingredientes que no necesiten consumirse en grandes cantidades para producir un efecto biológico, pues en ningún caso procede forzar el consumo de un alimento en cantidad o frecuencia excesiva. Por otra parte, no es recomendable incluir una cantidad muy alta de un ingrediente en un alimento, porque se podría alterar en forma desfavorable alguna de sus propiedades organolépticas, tales como la

textura, el sabor, el olor, el color, etc. Además, hay que tener en cuenta que los procesos para conseguir ingredientes bioactivos a veces son caros o complicados. Por lo tanto, la potencia de los ingredientes bioactivos que se quieren incluir en alimentos funcionales es muy importante. En este contexto, queremos resaltar que las dosis con eficacia antihipertensiva de FRP en las ratas SHR fueron dosis muy bajas. Todo apunta, por lo tanto, a que este extracto de *Fraxinus excelsior* L. que hemos estudiado, pudiera utilizarse como ingrediente funcional antihipertensivo. La utilización de extractos de plantas en la hipertensión podría ser menos peligrosa que la administración de los fármacos antihipertensivos clásicos, y cabe señalar que la seguridad y tolerabilidad de FRP para su consumo en sujetos sanos ya está demostrada (Flanagan et al., 2013). Antes de utilizar este extracto de forma rutinaria en la clínica, serían sin embargo necesarios algunos estudios para demostrar su eficacia antihipertensiva en humanos. Las propiedades antioxidantes y diuréticas de FRP, demostradas en esta Tesis Doctoral, permiten prever que este extracto pudiera resultar útil también en otras patologías distintas de la propia hipertensión. Su posible eficacia en ellas es un campo de investigación abierto. Por otra parte, el estudio de otros mecanismos de acción que pudieran justificar sus efectos sobre la presión arterial, distintos a los que hemos investigado en esta Tesis Doctoral, podría también ampliar el conocimiento científico de este extracto; algo que, como bien sabemos, resulta cada vez más recomendable en el caso de los ingredientes funcionales.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Con los Resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, hemos llegado a las siguientes Conclusiones:

1. El extracto de *Fraxinus excelsior* L. denominado FraxiPure (FRP) disminuye la presión arterial de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), pero su eficacia antihipertensiva en estos animales es menor que la de Captopril, y el incremento de la dosis de FRP no se acompaña siempre con un aumento de su efecto antihipertensivo.

2. El efecto de FRP sobre la presión arterial es específico de la condición de hipertensión, y no se observa en las ratas Wistar-Kyoto, que son el control normotenso de las ratas SHR.

3. El perfil antihipertensivo de FRP en las ratas SHR es bueno, ya que su efecto sobre la presión arterial sistólica es duradero y se mantiene cuando el extracto se administra de forma crónica, sin que se produzcan grandes fluctuaciones de esta variable.

4. FRP se comporta como diurético ahorrador de potasio en las ratas SHR, y su efecto sobre la excreción volumétrica de orina es comparable al de Torasemida, cuando se utilizan dosis de estos compuestos que producen efectos antihipertensivos semejantes. Por lo tanto, el efecto diurético de FRP podría justificar su efecto antihipertensivo.

5. Las propiedades antioxidantes de FRP podrían también justificar en parte sus efectos antihipertensivos en las ratas SHR, ya que este compuesto aumenta en ellas la capacidad antioxidante del plasma y disminuye la peroxidación lipídica.

6. El tratamiento continuado con FRP mejora la respuesta vasodilatadora endotelio dependiente de acetilcolina en las ratas SHR, posiblemente porque este compuesto neutraliza especies reactivas de oxígeno y mejora la biodisponibilidad del óxido nítrico.

7. FRP presenta propiedades orexigénicas dosis dependientes en las ratas SHR, y favorece la ganancia de peso corporal en estos animales.

8. Teniendo en cuenta la bioactividad de FRP y su buena potencia antihipertensiva en ratas SHR, demostradas en esta Tesis Doctoral, se concluye que este producto podría incluirse como ingrediente en algún alimento funcional, útil para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión. Aunque la seguridad de FRP en adultos sanos ya está demostrada, antes de la utilización comercial de este posible ingrediente funcional, serán necesarios estudios que demuestren su eficacia y seguridad en pacientes hipertensos.

9. La disminución de la ingesta líquida, observada en las ratas que consumían FRP, nos hace prever que en el proceso de adecuación tecnológica para incluir este extracto como ingrediente de un alimento funcional, se tendrá que prestar especial atención a sus propiedades organolépticas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abel PW, Jain N. α -Adrenoceptor assays. Current protocols in pharmacology 2012; chapter 4:unit 4.5.
- Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. Nutrition Research Reviews 2010; 23:37-46.
- Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. American Journal of Physiology 1948; 153:586-600.
- Andreoli SP. Captopril scavenges hydrogen peroxide and reduces, but does not eliminate, oxidant-induced cell injury. American Journal of Physiology 1993; 264:120-127.
- Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. New England Journal of Medicine 1997; 336:1117-1124.
- Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C, Wilson S. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. Nature 1984; 309:163-165.
- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. Toxicology In Vitro 2004; 18:555-5561.
- Bagchi D, Prasad R, Das DK. Direct scavenging of free radicals by captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989; 158:52-57.
- Baghdikian B, Lanhers MC, Fleurentin J, Ollivier E, Maillard C, Balabsard G, Mortier F. An analytical study, anti-inflammatory and analgesic effects of *Harpagophytum procumbens* and *Harpagophytum zeyheri*. Planta Medica 1997; 63:171-176.
- Bai N, He K, Ibarra A, Bily A, Roller M, Chen X, Ruhl R. Iridoids from *Fraxinus excelsior* with adipocyte differentiation-inhibitory and PPAR- α activation activity. Journal of Natural Products 2010; 73:2-6.

- Bakker GC, van Erk MJ, Pellis L, Wopereis S, Rubingh CM, Cnubben NH, Kooistra T, van Ommen B, Hendriks HF. An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men a: nutrigenomics approach. *American Journal of Clinical Nutrition* 2010; 91:1044-1059.
- Balti R, Bougatef A, Guillochon D, Dhulster P, Nasri M, Nedjar-Arroume N. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods* 2012; 4:611-617.
- Banegas JR. Evaluation of stroke risk in patients with hypertension. *Medicina Clínica* 2005; 125:254-256.
- Barney CC, Katovich MJ, Fregly MJ. The effect of acute administration of an angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril (SQ 14,225), on experimentally induced thirst in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1980; 12:53-57.
- Basar S, Uhlenhut K, Högger P, Schöne F, Westendorf J. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit. *Phytotherapy Research* 2010; 24:38-42.
- Basso N, Paglia N, Stella I, De Cavanagh EMV, Ferder L, Lores Arnaiz MR, Insera F. Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging. *Regulatory Peptides* 2005; 128:247-252.
- Baumgartner-Parzer SM, Waldenberger FR, Freudenthaler A, Ginouvès-Guerdoux A, McGahie D, Gatto H. The natural antioxidants, pomegranate extract and soy isoflavones, favourably modulate canine endothelial cell function. *ISRN Veterinary Science* 2012; 590328.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; 87:1620-1624.
- Bermejo P, Abad MJ, Díaz AM, Fernández L, De Santos J, Sánchez S, Villaescusa L, Carrasco L, Irurzun A. Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted

- from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. *Planta Medica* 2002; 68:106-110.
- Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR. and Ferreira D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 140:175-182.
- Bindels RJ, Van Os CH, Slegers JF. Effects of chlorothiazide, furosemide and PTH on Na⁺ and Ca²⁺ handling in isolated perfused kidneys of the spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Hypertension* 1987; 9:33-50.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1999; 51:971-974.
- Bohr VA, Anson RM. DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutation Research* 1995; 338:25-34.
- Boisvert C. *Plantes et Remèdes Naturels* 2003; 257-259.
- Boje K, Lechtenberg M, Nahrstedt A. New and known iridoid and phenylethanoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* and their in vitro inhibition of human leukocyte elastase. *Planta Medica* 2003; 69:820-825.
- Bourre JM. Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: what is actually useful? *Journal of Nutrition Health and Aging* 2005; 9:232-242.
- Brater DC, Leinfelder J, Anderson SA. Clinical pharmacology of torasemide, a new loop diuretic. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1987; 42:187-192.
- Brunkhorst R, Wrenger E, Kühn K, Schmidt FW, Koch K. Effect of captopril therapy on sodium and water excretion in patients with liver cirrhosis and ascites. *Klinische Wochenschrift Journal* 1989; 67:774-783.
- Buñag RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal of Applied Physiology* 1973; 34:279-282.

- Butt MS, Sultan MT. Green tea: nature's defense against malignancies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2009; 49:463-473.
- Cabassi A, Vinci S, Calzolari M, Bruschi G, Cavatorta A, Borghetti A. The relationship between regional sympathetic activity and the onset of arterial hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Cardiología* 1997; 42:393-396.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distant A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endotelial activation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23:622-629.
- Cano A, García-Pérez MA, Tarín JJ. Isoflavones and cardiovascular disease. *Maturitas* 2010; 67(3):219-226.
- Casadebaig J, Jacob M, Cassanas G, Gaudy D, Baylac G, Puech A. Physicochemical and pharmacological properties of spray-dried powders from *Fraxinus excelsior* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 1989; 26:211-216.
- Cathcart MK, Folcik VA. Liposygenases and atherosclerosis: protection versus patogénesis. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 28:1726-1734.
- Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 2008; 31:181-184.
- Chang IM. Antiviral activity of aucubin against Hepatitis B virus replication. *Phytotherapy Research* 1997; 11:189-192.
- Chen TY, Chi KH, Wang JS, Chien CL, Lin WW. Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses. *Free Radical Biology and Medicine* 2009; 46: 643-655.
- Cheng-Yu T, Yue-Hwa C, Yi-Wen C, Wen-Hsuan H, Shyh-Hsiang L. Effect of soy saponin on the growth of human colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16(27):3371-3376.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hipertensión* 1998;

- 31:643-648.
- Chow L, De Gasparo M, Levens M. Blockade of angiotensin converting enzyme but not of angiotensin AT1 receptors improves glucose tolerance. *European Journal of Pharmacology* 1997; 319:77-83.
- Cicero AF, Gerocarni B, Laghi L, Borghi C. Blood pressure lowering effect of lactotripeptides assumed as functional foods: a meta-analysis of current available clinical trials. *Journal of Human Hypertension* 2011; 25:425-436.
- Cienfuegos-Jovellanos E, Quiñones MM, Muguerza B, Moulay L, Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57:6156-6162.
- Cifuentes ME, Pagano PJ. Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2006; 15:179-186.
- Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: Therapeutic potential *Pharmacology & Therapeutics* 2006; 111:81-98.
- Corson TW, Crews CM. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell* 2007; 130(5):769-774.
- Costa De Pasquale R, Busa G, Circosta C. *Harpagophytum procumbens* D.C. III. Effects on hyperkinetic ventricular arrhythmias by reperfusion. *Journal of Ethnopharmacology* 1985; 13:193-199.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001; 1:569-590.
- Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:25409-25412.
- Cruickshank J, Thorp JM, Zacharias FJ. Benefits and potential harm of lowering high blood pressure. *Lancet* 1987; 1:581-584.
- Cuevas P, García-Calvo M, Arceller F, Carceller F, Reimers D, Zazo M,

- Cuevas B, Muñoz-Willery I, Martínez-Coso V, Lamas S, Giménez-Gallego G. Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. Proceedings of the National Academy of Sciences 1996; 93:11996-12001.
- De Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L, Romano L, Ercole L, Fraga CG. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. FEBS Letters 1995; 361:22-24.
- Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL. PPAR- α activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. Hypertension 2002; 40:866-871.
- Dinda B, Debnath S, Banik R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 2011; 59:803-833.
- Dingermann T, Hiller K, Schneider G, Zündorf I. Arzneidrogen Elsevier-Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. British Journal of Nutrition 1998; 80:77-112.
- Donkó A, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geistz M. Dual oxidases. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 2005; 360:2301-2308.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews 2002; 82:47-95.
- Dröge W, Schipper HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. Aging Cell 2007; 6:361-370.
- Dunn CJ, Fitton A, Brogden RN. Torasemide: an update of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. Drugs 1995; 49:121-142.
- Eddouks M, Maghrani M. Phlorizin-like effect of *Fraxinus excelsior* in normal and diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 2004; 94:149-154.

- Eddouks M, Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Michel JB. *Fraxinus excelsior* L. evokes a hypotensive action in normal and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 99:49-54.
- El-Ghazaly M, Khayyal MT, Okpanyi SN, Arens-Corell M. Study of the anti-inflammatory activity of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior*. *Arzneimittelforschung* 1992; 42:333-336.
- El-Naggar, Beal JL. Iridoids, a review. *Journal of Natural Products* 1980; 43:649-707.
- Farrell MH, Foody JM, Krumholz HM. β -adrenoceptor antagonists in heart failure. Clinical applications. *JAMA* 2002; 287:890-897.
- Farzaneh-Far R, Lin J, Epel ES, Harris WS, Blackburn EH, Whooley MA. Association of marine omega-3 fatty acids levels with telomeric aging in patients with coronary heart disease. *Journal of the American Medical Association* 2010; 303:250-257.
- Fernández Vallinas S, López Carreras N, Miguel M, Aleixandre A. Short-term antihypertensive and vascular relaxing effects of a soluble cocoa fiber product in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 2012; 30:e-Supplement A.
- Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15:247-254.
- Flanagan J, Meyer M, Pasamar MA, Ibarra A, Roller M, Alvarez i Genohar N, Leiva S, Gómez-García F, Alcaraz M, Martínez-Carrasco A, Vicente V. Safety evaluation and nutritional composition of a *Fraxinus excelsior* seed extract, FraxiPure™. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 53:10-17.
- Folkow B. "Structural factors" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 1990; 16:89-101.
- Fortuño A, Oliván S, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *Journal of Hypertension* 2004; 22:2169-2175.
- Fregly MJ, Rowland NE. Bradykinin-induced dipsogenesis in captopril-treated

- rats. Brain Research Bulletin 1991; 26(1):169-172.
- Fu G, Ip FC, Pang H, Ip NY. New secoiridoid glucosides from *Ligustrum lucidum* induce ERK and CREB phosphorylation in cultured cortical neurons. Planta Medica 2010; 76:998-1003.
- Fujimura A, Ebihara A. Chronopharmacological study of furosemide in rats: (III). Examination in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. Life Sciences 1989; 45(25):2459-2464.
- Furberg CD, Psaty BM, Meyer JV. Nifedipine; dose-related increase in patients with coronary heart disease. Circulation 1995; 62:1326-1331.
- Furchgott RF, Zawadki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980; 288:373-376.
- Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. Bioscience Reports 1999; 19:235-251.
- Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 2008; 45:1-23.
- García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Nevedomskaya E, Mayboroda OA, Deelder AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Exploratory analysis of human urine by LC-ESI-TOF MS after high intake of olive oil: understanding the metabolism of polyphenols. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2010; 398:463-475.
- Gerbes AL. The role of atrial natriuretic peptide (ANP) in chronic liver disease. Pharmacology & Therapeutics 1993; 58:381-390.
- Gilani AH, Mandukhail S, Iqbal J, Yasinzaï M, Aziz N, Khan A, Najeeb-ur-Rehman. Antispasmodic and vasodilator activities of *Morinda citrifolia* root extract are mediated through blockade of voltage dependent calcium channels. BMC Complementary and Alternative Medicine 2010; 10:2.
- Godfraind T. Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis.

- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 2005; 360:2259-2272.
- Goldberg AA, Richard VR, Kyryakov P, Bourque SD, Beach A, Burstein MT, Glebov A, Koupaki O, Boukh-Viner T, Gregg C, Juneau M, English AM, Thomas DY, Titorenko VI. Chemical genetic screen identifies lithocholic acid as an anti-aging compound that extends yeast chronological life span in a TOR-independent manner, by modulating housekeeping longevity assurance processes. *Aging* 2010; 2(7):393-414.
- Grahame R, Robinson BV. Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*): pharmacological and clinical studies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1981; 40:632.
- Granger JP, Alexander BT. Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of nitric oxide. *Acta Physiologica Scand* 2000; 168:161-168.
- Griendling KK, Sorescu D, Lasségue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2000; 20:2175-2183.
- Gundermann KJ, Müller J. Phytodolor® - effects and efficacy of a herbal medicine. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 2007; 157:343-347.
- Ha H, Kim KH. Amelioration of diabetic microalbuminuria and lipid peroxidation by captopril. *Yonsei Medical Journal* 1992; 33:217-223.
- Hallikainen M, Kurl S, Laakso M, Miettinen TA, Gylling H. Plant stanol esters lower LDL cholesterol level in statin-treated subjects with type 1 diabetes by interfering the absorption and synthesis of cholesterol. *Atherosclerosis* 2011; 217(2):473-478.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1990; 280:1-8.
- Hanbury D. On the febrifuge properties of the olive (*Olea Europaea*, L.). *Biophysical Research Communications* 1854; 334:769-778.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Hydrogen peroxide and nitric oxide in plant defence: revealing potential targets for oxidative stress tolerance?

- Biofactors 2001; 15:99-101.
- Haraguchi H, Tanaka Y, Kabbash A, Fujioka T, Ishizu T, Yagi A. Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*. Phytochemistry 2004; 65:2255-2260.
- Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. Medical Clinics of North America 2009; 93(3):621-635.
- Hasnain BI, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: what should we be telling our patients? Cleveland Clinic Journal of Medicine 2004; 71:327-334.
- Hattesohl M, Feistel B, Sievers H, Lehnfeld R, Hegger M, Winterhoff H. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. Phytomedicine 2008; 15:2-15.
- Hazelhoff B, Malingre TM, Meijer DK. Antispasmodic effects of valeriana compounds: an in-vivo and in-vitro study on the guinea-pig ileum. Archives internationals de pharmacodynamie et de thérapie 1982; 257:274-287.
- He K, Roller M, Bily A, Bai N, DiKansky J, Ibarra A. Extract of *Fraxinus excelsior* seeds and therapeutic applications therefor, 2008. PCT/US2008/082524.
- Hedrick UP. Sturtevant's Notes on Edible Plants. State of New York-Department of Agriculture. J.B. Lyon Company, Albany 1919; 282-283.
- Heinicke R. The pharmacologically active ingredient of noni. Bulletin of the National Tropical Garden 1985; 15(1):10-14.
- Hellstrom JK, Shikov AN, Makarova MN, Pihlanto AM, Pozharitskaya ON, Ryhänen E-L, Kivijärvi P, Makarov VG, Mattila PH. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii*, var. *Viking*). Journal of Functional Foods 2010; 2:163-169.
- Hirsch AT, Talsness CE, Smith AD, Schunkert H, Ingelfinger JR, Dzau VJ. Differential effects of captopril and enalapril on tissue renin-angiotensin systems in experimental heart failure. Circulation 1992; 86:1566-1574.

- Hooper PL, Tytell M. Xenohormesis: health benefits from an eon of plant stress response evolution. *Lászlo Vigh Cell Stress and Chaperones* 2010; 15:761-770.
- Howitz KT, Sinclair DA. Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell* 2008; 133:387-391.
- Husain A. The chymase-angiotensin system in humans. *Journal of Hypertension* 1993; 11:1155-1159.
- Ibarra A, Bai N, He K, Bily A, Cases J, Roller M, Sang S. *Fraxinus excelsior* seed extract FraxiPure™ limits weight gains and hyperglycemia in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine* 2011; 18:479-485.
- Jaffé M. Hoppe-Seyler's Z serum creatinine estimation. *Physiological Chemist* 1886; 10:391-400.
- Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha tocophenol therapy. *Free Radical Research* 2002; 36:1331-1336.
- Jiménez Martínez MC, Maceira Cubiles MA, Martínez Martín SM, Pérez de Alejo JL, Montero González T. Efecto de Noni-C sobre el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2013; 18(1):92-99.
- Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BH. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry* 2000; 286:35-37.
- Kaplan NM. Obesity in hypertension: effects on prognosis and treatment. *Journal of Hypertension. Supplement* 1998; 16(1):35-37.
- Kaplan RC, Bhalodkar NC, Brown EJ Jr, White J, Brown DL. Race, ethnicity and sociocultural characteristics predict noncompliance with lipid-lowering medications. *Preventive Medicine* 2004; 39:1249-1255.
- Katugampola SD, Davenport AP. Radioligand binding reveals chymase as the predominant enzyme for mediating tissue conversion of angiotensin I in the normal human heart. *Clinical Science* 2002; 102(1):15-21.
- Keaney JF Jr, Vita JA. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant

- protection in endothelium-derived relaxing factor action. Progress in Cardiovascular Diseases 1995; 38:129-154.
- Khayyal MT, el-Ghazaly MA, Abdallah DM, Nassar NN, Okpanyi SN, Kreuter MH. Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. Arzneimittelforschung 2002; 52:797-802.
- Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. Hypertension 1999; 33:1353-1358.
- Kikuchi T, Matsuda S, Kubo Y, Namba T. New iridoids from *Harpagophytum procumbens* D.C. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 1983; 31:2296-2301.
- Kim B, Jang Y, Paik JK, Kim OY, Lee SH, Ordovas JM, Lee JH. Adiponectin gene polymorphisms are associated with long-chain ω 3-polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids in nondiabetic Koreans. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2010; 95:347-351.
- Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Dhicokawa H, Takeshita A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Circulation 2004; 109:2354-2362.
- Kitiyakara C, Wilcox CS. Antioxidants for hypertension. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 1998; 7:531-538.
- Koch-Weser J. Medical intelligence drug therapy. New England Journal of Medicine 1976; 295(6):320-323.
- Kojima A, Kubota T, Sato A, Yamada T, Yamori Y, Okamoto K. Congenital abnormality of pituitary-thyroid axis in spontaneously hypertensive rats (SHR) and stroke-prone rats (SPR). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1975; 150(3):571-573.
- Konoshima T, Takasaki M, Tokuda H, Nishino H. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga*

- decumbens*. Cancer Letters 2000; 157:87-92.
- Konstantinidou V, Covas MI, Muñoz-Aguayo D, Khymenets O, de la Torre R, Saez G, Tormos Mdel C, Toledo E, Marti A, Ruiz-Gutiérrez V, Ruiz Mendez MV, Fito M. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 2010; 24:2546-2557.
- Kost CK, Rominski BR, Herzer WA, Jackson EK, Tofovic SP. Persistent improvement of cardiovascular risk factors in spontaneously hypertensive rats following early short-term captopril treatment. Clinical and Experimental Hypertension 2000; 22(2):127-143.
- Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? Free Radical Research Communications 1993; 19:59-66.
- Kunkel G. Plants for Human Consumption. Koeltz Scientific Books, Koenigstein 1984.
- Labiós M, Martínez M, Gabriel F, Guiral V, Navarro B. Efecto del telmisartán en el estrés oxidativo y actividad antioxidante en leucocitos de sangre periférica de pacientes hipertensos. Hipertensión y Riesgo Vascular 2011; 28(2):48-54.
- Lahouel M, Amedah S, Zellagui A, Touil A, Rhouati S, Benyache F, Leghouchi E, Bousseboua H. The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxydant effect and flavonoids concentration. Therapie 2006; 61:347-355.
- Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. Molecular Microbiology 2004; 53:1003-1009.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann I, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. Journal of Clinical Investigation 2003; 111:1201-1209.
- Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ. Differentiation of receptors responsive to

- isoproterenol. Life Sciences 1967; 6:2241-2249.
- Lanthers MC, Fleurentin J, Mortier F, Vinche A, Younos C. Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. Planta Medica 1992; 58:117-123.
- Lattka E, Illig T, Heinrich J, Koletzko B. FADS gene cluster polymorphisms: important modulators of fatty acid levels and their impact on atopic diseases. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics 2009; 2:119-128.
- Leary WP, Reyes AJ, Van der Byl KV, Acosta-Barrios TN. Effects of captopril, hydrochlorothiazide, and their combination on timed urinary excretions of water and solutes. Journal of Cardiovascular Pharmacology 1985; 7:56-62.
- Leathwood PD, Chauffard F, Heck E, Munoz-Box R. Aqueous extract of valerian root (*Valeriana officinalis* L.) improves sleep quality in man. Pharmacology Biochemistry & Behavior 1982; 17:65-71.
- Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. Antioxidants & Redox Signaling 2008; 10(6):1045-1059.
- Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, Chang YT, Huang PL. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. Biochemical & Biophysical Research Communications 2003; 307:1029-1037.
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provart N, Patel R, Myers CR, Reidel EJ, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell TP. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. Nature Genetics 2010; 42:1060-1067.
- Li Y, Zuo Y, Sun WJ. Study on antioxidant activity of two major secoiridoid glucosides in the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait. Zhong Yao Cai 2007; 30:543-546.
- Lin HM, Yen FL, Ng LT, Lin CC. Protective effects of *Ligustrum lucidum* fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats. Journal of Ethnopharmacology 2007; 111(1):129-136.
- Lin-Hua W, Zeng-Lai X, Di D, Shan-An H, Hong Y. Protective effect of

- anthocyanins extract from blueberry on TNBS-Induced IBD model of mice. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2011; 2011:525462.
- Lindholm LH, Persson M, Alaupovic P, Carlberg B, Svensson A, Samuelsson O. Metabolic outcome during 1 year in newly detected hypertensives: results of the antihypertensive treatment and lipid profile in a north of Sweden efficacy evaluation (ALPINE study). Journal of Hypertension 2003; 21(8):1563-1574.
- Lipschitz WL, Haddian Z, Kerpskar A. Bioassay of diuretics. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1943; 79:110-116.
- Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. Circulation Research 2005; 97:967-974.
- López-Miranda V, Civantos B, Blasco R, Fernández R, Aleixandre MA. Parathyroid hormone and calcitriol in the hipertensión caused by dietary calcium deficiency in rats. Journal of Vascular Research 1998; 35:397-404.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 1951; 193:265-275.
- Macheix J, Fleuriet A, Billot J. Fruit Phenolics. CRC Press: Boca Raton FL 1990; 1-126.
- Maghrani M, Zeggwagh NA, Lemhadri A, El Amraoui M, Michel JB, Eddouks M. Study of the hypoglycaemic activity of *Fraxinus excelsior* and *Silybum marianum* in an animal model of type 1 diabetes mellitus. Journal of Ethnopharmacology 2004; 91:309-316.
- Malinski T, Kapturczak M, Dayhsh J, Bohr D. Nitric oxide synthase activity in genetic hypertension. Biochemical and Biophysical Research Communications 1993; 194:654-658.
- Manchado A, Cervantes González J, Obregón L. Evidencias sobre la hormesis por Radón-222 en el Balneario Elguea, Cuba. Memorias de la Primera Convención de Ciencias de la Tierra 2005.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M,

- Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Waeber B, Zannad F. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension* 2013; 31(7):1281-1357.
- Manso MA, Miguel M, Even J, Hernández R, Aleixandre A, López-Fandiño R. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 2008; 109:361-367.
- Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005; 365(9464):1046-1053.
- Marín-García J, Goldenthal MJ. The mitochondrial organelle and the heart. *Revista Española de Cardiología* 2002; 55:1293-1310.
- Masterton GS, Plevris JN, Hayes PC. Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2010; 31:679-692.
- McCaa RE, Gillespie JB. Effects of captopril and enalapril on sodium excretion and blood pressure in sodium-deficient dogs. *Federation Proceedings Journal* 1984; 43:1336-1341.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Chemical Biology* 1969; 244(22):6049-6055.
- Medina I, Alcántara D, González MJ, Torres P, Lucas R, Roque J, Plou FJ, Morales JC. Antioxidant activity of resveratrol in several fish lipid matrices: effect of acylation and glucosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58:9778-9786.
- Meera KS, Marcus SR. *Endothelial* 2012; 1(3):84-89.

- Mendes R, Gonçalves A, Pestana J, Pestana C. Indole production and deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) decomposition. European Food Research and Technology 2005; 221:320-328.
- Meyer B, Schneider W, Elstner EF. Antioxidative properties of alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. Arzneimittelforschung 1995; 45:174-176.
- Mian-Ying W, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Su C, Palu AK, Anderson G. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. Acta Pharmacologica Sinica 2002; 23(12):1127-1141.
- Mian-Ying W, Nowicki D, Anderson G, Jensen J, West B. Liver protective effects of *Morinda citrifolia* (noni). Plant Foods for Human Nutrition 2008; 63(2):59-63.
- Middleton P, Stewart F, Al-Qahtani S, Egan P, O'Rourke C, Abdulrahman A, Byres M, Middleton M, Kumarasamy Y, Shoeb M, Nahar L, Delazar A, Sakder D. Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Pavaper rhoeas*. International Journal of Pharmaceutical Research 2005; 2:81-86.
- Miguel M, Muguerza B, Sánchez E, Delgado MA, Recio I, Ramos M, Aleixandre MA. Changes in arterial blood pressure caused in hypertensive rats by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* cect 5728. British Journal of Nutrition 2005; 93:36-43.
- Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre MA. Long-term antihypertensive effect of egg white treated with pepsin in hypertensive rats. Life Sciences 2006; 78, 2960-2966.
- Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. Reactive oxygen species in the cerebral circulation: are they all bad? Antioxidants & Redox Signaling 2006; 8:1113-1120.
- Miyagoshi M, Amagaya S, Ogihara Y. Choleretic actions of iridoid compounds. Pharmacobiodynamics 1988; 11:186-189.
- Moncada S, Vane JR. Prostacyclin and its clinical applications. Annals of Clinical Research 1984; 16:241-252.

- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991; 43:109-142.
- Montezano AC, Touyz RM. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies. *Annals of Medicine* 2012; 44:2-16.
- Motwani JG, Fenwick MK, Morton JJ, Struthers AD. Furosemide-induced natriuresis is augmented by ultra-low-dose captopril but not by standard doses of captopril in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 86:439-445.
- Morazzoni P, Bombardelli E. *Valeriana officinalis*: traditional use and recent evaluation of activity. *Fitoterapia* 1995; 66:99-112.
- Moussard C, Alber D, Toubin MM, Thevenon N, Henry JC. Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. *Planta Medica* 1992; 58:117-123.
- Mulvany MJ. Mechanical and other factors involved in vascular injury related to hypertension. *Blood pressure Supplement* 1994; 1:11-17.
- Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Annals of Medicine* 2008; 40:180-196.
- Murakami N, Ye Y, Kawanishi M, Aoki S, Kudo N, Yoshida M, Nakayama EE, Shioda T, Kobayashi M. New Rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from *Valerianae Radix*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002; 12:2807-2810.
- Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. *Herbal Medicines: A Guide for Health-Care professionals*. Pharmaceutical Press 1996; 296.
- Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 1997; 30:405-408.
- Nose K. Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2000; 23:897-903.
- Occhiuto F, Circosta C, Ragusa S, Ficarra P, Costa De Pasquale R. A drug used in traditional medicine: *Harpagophytum procumbens* D.C. IV.

- Effects on some isolated muscle preparations. *Journal of Ethnopharmacology* 1985; 13:201-208.
- Odemuyiwa O, Gilmartin J, Kenny D, Hall RJ. Captopril and the diuretic requirements in moderate and severe chronic heart failure. *European Heart Journal* 1989; 10:586-690.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* 1963; 27:282-293.
- Okpanyi SN, Schirpke-von Paczensky R, Dickson D. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effect of various plant extracts and their combinations in an animal model. *Arzneimittelforschung* 1989; 39:698-703.
- Oliveira PJ, Goncalves L, Monteiro P, Providencia LA, Moreno AJ. Are the antioxidant properties of carvedilol important for the protection of cardiac mitochondria? *Current Vascular Pharmacology* 2005; 3:147-158.
- Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 96:2181-2196.
- Öztürk N, Korkmaz S, Öztürk Y, Baser KHC. Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra*), on cultured chicken embryonic fibroblasts, *Planta Medica* 2006; 72:289-294.
- Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991; 37:166-180.
- Palatini P, Julius S. Heart rate and the cardiovascular risk. *Journal of Hypertension* 1997; 15:3-17.
- Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 158:348-352.
- Parati G, Mancia G. Blood pressure variability as a risk factor. *Blood Pressure Monitoring* 2001; 6(6):341-347.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and

- hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; 31:170-180.
- Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Pariza MW. Effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods* 2010; 2:54-59.
- Parsa A. Medicinal plants and plant origin in Iran III. *Plant Foods for Human Nutrition* 1959; 6:137-156.
- Pepine CJ. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *American Journal of Cardiology* 1998; 82:23-27.
- Pepine CJ, Cooper-Dehoff RM. Cardiovascular therapies and risk for development of diabetes. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 44(3):509-512.
- Peterson A. Iridoids in Tahitian Noni® bioactive beverages™ are found to be extremely stable, 2000. Tahitian Noni International: http://www.prweb.com/releases/Tahitian_Noni/iridoids/prweb3651714.htm.
- Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P, McCullough ML. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition reviews* 2010; 68:571-603.
- Pettinger WA. Minoxidil and the treatment of severe hypertension. *New England Journal of Medicine* 1980; 303:922-926.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research* 1998; 39:77-88.
- Polizio AH, Peña C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. *Regulatory Peptides* 2005; 128(1):1-5.
- Praetorius E, Poulsen H. Enzymatic determination of uric acid; with detailed directions. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 1953; 5(3):273-280.
- Pringle E, Phillips C, Thijs L, Davidson C, Staessen JA, De Leeuw PW,

- Jaaskivi M, Nachev C, Parati G, O'Brien ET, Tuomilehto J, Webster J., Bulpitt CJ, Fagard RH. Systolic blood pressure variability as a risk factor for stroke and cardiovascular mortality in the elderly hypertensive population. *Journal of Hypertension* 2003; 21:2251-2257.
- Psaty BM, Hechbert SR, Koepsell TD, Siscovick DS, Lemaitre R, Smith NL, Wahl PW, Wagner EH, Furberg CD. The risk of myocardial infarction associated with antihypertensive drug therapy. *Journal of the American Medical Association* 1995; 274:620-625.
- Qi J, Chen JJ, Cheng ZH, Zhou JH, Yu BY, Qiu SX. Iridoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw). *Phytochemistry* 2006; 67:1372-1377.
- Quan J, Piao L, Xu H, Li T, Yin X. Protective effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2009; 73(4):849-854.
- Quesada S, Azofeifa G, Jatunov S, Jiménez G, Navarro L, Gómez G. Carotenoids composition, antioxidant activity and glycemic index of two varieties of *Bactris gasipaes*. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 2011; 23(6):482-489.
- Quiñones M, Sánchez D, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A. Efecto agudo de los principales polifenoles del cacao sobre la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas. *Hipertensión* 2009; 26:5.
- Quiñones M, Sánchez D, Muguerza B, Moulay L, Laghi S, Miguel M, Aleixandre A. Long-term intake of CocoanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertension rats. *Food Chemistry* 2010; 112:1013-1019.
- Ramírez JH, Palacios M, Gutiérrez O. Efecto diurético de la especie *Salvia scutellarioides* en ratas. *Biomédica* 2006; 26:145-149.
- Ratliff J, Leite JO, de Ogburn R, Puglisi MJ, VanHeest J, Fernández ML. Consuming eggs for breakfast influences plasma glucose and ghrelin, while reducing energy intake during the next 24 hours in adult men. *Nutrition Research* 2010; 30:96-103.

- Recio MC, Giner RM, Manez S, Rios JL. Structural considerations on the iridoids as antiinflammatory agents. *Planta Medica* 1994; 60: 232-234.
- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radical and other reactive oxygen metabolites. *American Journal of Surgery* 1991; 161:488-503.
- Rhodin JA. Microscopic anatomy of the pulmonary vascular bed in the cat lung. *Microvascular Research* 1978; 15:169-193.
- Ribeiro RA, Fiuza de Melo MM, De Barros F, Gomes C, Trolin G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo. *Journal of Ethnopharmacology* 1986; 15(3):261-269.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* 2010; 104:1-63.
- Rodríguez-Martínez, M.A. & Ruiz-Torres, A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 1992; 66:213-222.
- Sagar S, Kallo IJ, Kaul N, Ganguly NK, Sharma BK. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1992; 111:103-108.
- Saicic ZS, Pajovic SB, Korac B, Spasic MB, Martinovic JV, Petrovic VM. Glutathione-dependent antioxidant enzyme activities and glutathione content in the rat brain at different stages of oestrous cycle. *Physiological Research* 1998; 47:61-67.
- Salm P, Taylor PJ, Kostner K. Simultaneous quantification of total eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and arachidonic acid in plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 2011; 25:652-659.
- Sánchez A, Vidal MJ, Martínez-Sierra R, Saiz J. Ontogeny of renal alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the spontaneously hypertensive rat.

- Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1986; 237:972-979.
- Saravanan P, Davidson NC, Schmidt EB, Calder PC. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. Lancet 2010; 376:540-545.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2005; 45: 287-306.
- Scheen A, Vancrombreucq J, Delarge J, Luyckx AS. Diuretic activity of torasemide and furosemide in chronic heart failure: a comparative double blind cross-over study. European Journal of Clinical Pharmacology 1986; 31:35-42.
- Schempp H, Weiser D, Elstner EF. Biochemical model reactions indicative of inflammatory processes. Activities of extracts from *Fraxinus excelsior* and *Populus tremula*. Arzneimittelforschung 2000; 50:362-372.
- Schneider R, Iscovitz H, Ilan Z, Bernstein K, Gros M, Iaina A. Oxygen free radical scavenger system intermediates in essential hypertensive patients before and immediately after sublingual captopril administration. Israel Journal of Medical Sciences 1990; 26:491-495.
- Schmieder A, Schwaiger S, Csordas A, Backovic A, Messner B, Wick G, Stuppner H, Bernhard D. Isogentisin - A novel compound for the prevention of smoking-caused endothelial injury. Atherosclerosis 2007; 194:317-325.
- Scholle JM, Baker WL, Talati R, Coleman CI. The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: systematic review and meta-analysis. Journal of the American College of Nutrition 2009; 28:517-524.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. Antioxidants & Redox Signaling 2008; 10:1115-1126.
- Sebastià J, Cristòfol R, Martín M, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C. Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and Neuroblastoma SH-SY5Y.

- Cytometry A 2003; 51(1):16-25.
- Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Macchioni A, Montedoro GF. Phenolic compounds of olive fruit: one and two dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1999; 47:12-18.
- Siddiqui AH, Hussain T. Enhanced AT1 receptor-mediated vasocontractile response to ANG II in endothelium-denuded aorta of obese Zucker rats. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 2007; 292(4):1722-1727.
- Silva S, Gomes L, Leitão F, Bronze M, Coelho AV, Vilas Boas L. Secoiridoids in olive seed: characterization of nuzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. Grasas y Aceites 2010; 61:157-164.
- Sipola M, Finckenberg P, Santisteban J, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen ML. Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. Journal of Physiology and Pharmacology 2001; 52:745-754.
- Smith TL, Hutchins PM. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. American Journal of Physiology 1980; 238:539-544.
- Soares S, André Sousa A, Nuno Mateus N, Victor de Freitas V. Effect of condensed tannins addition on the astringency of red wines. Chemical Senses 2012; 37(2):191-198.
- Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. Free Radical Biology and Medicine 1990; 9:495-500.
- Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. Journal of Ethnopharmacology 2003; 84:299-305.

- Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research* 2005; 68(2):66-74.
- Soulimani R, Younos C, Mortier F, Derrieu C. The role of stomachal digestion on the pharmacological activity of plant extracts, using as an example extracts of *Harpagophytum procumbens*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1994; 72:1532-1536.
- Southam CM, Ehrlich J. Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 1943; 33:517-524.
- Stadtman ER. Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. *Methods in Enzymology* 1995; 258:379-393.
- Stewart KM, Cole D. The commercial harvest of devil's claw (*Harpagophytum spp.*) in southern Africa: The devil's in the details. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 100:225-236.
- Strazzullo P, Puig JG. Uric acid and oxidative stress: relative impact on cardiovascular risk? *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2007; 17:409-414.
- Strehl E, Schneider W, Elstner EF. Inhibition of dihydrofolate reductase activity by alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. *Arzneimittelforschung* 1995; 45:172-173.
- Susalit E, Agus N, Effendia I, Tjandrawinatac RR, Nofiarnyc D, Perrinjaquet-Moccettid T, Verbruggend M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine* 2011; 18:251-258.
- Suzuki K, Nakamura M, Hatanaka Y, Kayanoki Y, Tatsumi H, Taniguchi N. Induction of apoptotic cell death en human endothelial cells treated with snake venom: implication of intracellular reactive oxygen species and protective effect of glutathione and superoxide dismutases. *Journal of Biochemistry* 1997; 122:1260-1264.
- Swales JD. Economics and the treatment of hypertension. *Journal of Hypertension* 1995; 13:1357-1361.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Endothelial dysfunction

- in hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2001; 38:11-14.
- Talke H, Schubert GE. Enzymatische harnstoffbestimmung im blut und serum im optischen test nach warburg. *Wiener Klinische Wochenschrift* 1965; 43:174-175.
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42:1075-1081.
- Terashvili M, Pratt PF, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder DR. Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease. *Pediatric Clinics of North America* 2006; 53:1029-1037.
- Toda S. Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. *Chinese Medicine* 2011; 2:29-31.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology* 2004; 122:339-352.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxidants & Redox Signaling* 2008; 10:1041-1044.
- Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rats. *Circulation Research* 1981; 48:309-311.
- Tulunoglu O, Alacam A, Bastug M, Yavuzer S. Superoxide dismutase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in children. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 1998; 22:341-345.
- Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry* 2002; 67:281-292.
- Uchida T, Kido H, Yamanaga K, Okita M, Watanabe M. A novel loop diuretic, torasemide, inhibits thromboxane A₂-induced contraction in the isolated canine coronary artery. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1992; 45(2):121-124.
- Uechi M, Matsouka M, Kuwajima E, Keneko T, Yamashita K, Fukushima U, Ishikawa Y. The effects of loop diuretics furosemide and torasemide

- on diuresis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 2003; 65(10):1057-1061.
- Ülker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovascular Research* 2003; 59:488-500.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:44-84.
- Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *Journal of Hypertension* 2004; 22:535-542.
- Visen P, Saraswat B, Visen A, Roller M, Bily A, Mermet C, He K, Bai N, Lemaire B, Lafay S, Ibarra A. Acute effects of *Fraxinus excelsior* L. seed extract on postprandial glycemia and insulin secretion on healthy volunteers. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 126:226-232.
- Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition* 2004; 58:955-965.
- Von Krüedener S, Schneider W, Elstner EF. A combination of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior* as an anti-inflammatory and antirheumatic drug. A short review. *Arzneimittelforschung* 1995; 45:169-171.
- Wagner RD, Johnson SJ, Kurniasih Rubin D. Probiotic bacteria are antagonistic to *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* and influence host lymphocyte responses in human microbiota-associated immunodeficient and immunocompetent mice. *Molecular Nutrition & Food Research* 2009; 53:377-388.
- Wang MY, Su C. Cancer Preventive Effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Annals New York Academy of Sciences* 2001; 952:161-168.
- Wang PC, Hu JM, Ran XH, Chen ZQ, Jiang HZ, Liu YQ, Zhou J, Zhao YX. Iridoids and sesquiterpenoids from the roots of *Valeriana officinalis*.

- Journal of Natural Products 2009; 72:1682-1685.
- Watt JM, BreYer-Brandwijk MG. The medicinal and poisonous plants of southern Africa, Livingston Press 1962; 830-832.
- West BJ, Palmer SK, Deng S, Palu AK. Antimicrobial activity of an iridoid rich extract from *Morinda citrifolia* fruit. Current Research Journal of Biological Science 2012; 4(1): 52-54.
- Westlin W, Mullane K. Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? Circulation 1988; 77:30-39.
- Wilcox CS. Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. Acta Physiologica Scandinavica 2003; 179:217-223.
- Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. Nephron Physiology 2003; 93:3-13.
- Wolfgang WH, Wolfram P. Thiols and the chemoprevention of cancer. Current Opinion in Pharmacology 2007; 7:404-409.
- Wolf-Maier K. Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. Hypertension 2004; 43:10-17
- Wright CI, Van-Buren L, Kroner CI, Koning MMG. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. Journal of Ethnopharmacology 2007; 114:1-31.
- Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. American Journal of Physiology 1982; 243:365-370.
- Wu J, Ding X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry 200; 49:501-506.
- Yorifuji T, Tsuda T, Kashima S, Takao S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and its effects on hypertension in Minamata. Environmental Research 2010; 110:40-46.
- Young D, Mine Y. Nutrigenomics and proteomics in health and disease. Food

- factors and gene interactions. Wiley-Blackwell 2009; 129-144.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22 (phox) gene in hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005; 7:1327-1336.
- Zicha J, Kunes J. Ontogenic aspects on hypertension development. Analysis in the rat. *Physiological Reviews* 1999; 79:1227-1282.
- Zhu L, Liu Z, Feng Z, Hao J, Shen W, Li X, Sun L, Sharman E, Wang Y, Wertz K, Weber P, Shi X, Liu J. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2010; 21:1089-1098.

